

Trabalho de Conclusão de curso

AVALIAÇÃO DE ENXERTO DE MATRIZ DE CELULOSE BACTERIANA E MATRIZ DÉRMICA ACELULAR (SUREDERM®) ASSOCIADOS OU NÃO À CULTURA PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS: ESTUDO EM RATOS

Raí Heidenreich



**Universidade Federal de Santa Catarina
Curso de Graduação em Odontologia**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

Raí Heidenreich

**AVALIAÇÃO DE ENXERTO DE MATRIZ DE CELULOSE
BACTERIANA E MATRIZ DÉRMICA ACELULAR
(SUREDERM[®]) ASSOCIADOS OU NÃO À CULTURA
PRIMÁRIA DE FIBROBLASTOS: ESTUDO EM RATOS**

Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como
requisito para a conclusão do Curso
de Graduação em Odontologia.
Orientador: Prof. Dr. César Augusto
Magalhães Benfatti

Florianópolis
2016

Raí Heidenreich

**AValiação de enxerto de matriz de celulose
bacteriana e matriz dérmica acelular
(SUREDERM[®]) associados ou não à cultura
primária de fibroblastos: estudo em ratos**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado, adequado para obtenção do Título de Cirurgião-Dentista e aprovado em sua forma final pelo Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 19 de Maio de 2016

Banca Examinadora:

Prof. Dr. César Augusto Magalhães Benfatti
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo de Souza Magini
Universidade Federal de Santa Catarina

Cirurgião-Dentista, Abraão Moratelli Prado
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico este trabalho aos meus pais,
José Osvaldo e Isolete, por todo o
esforço, dedicação e amor; pela
preocupação com a minha educação
e formação como profissional e ser
humano.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela bênção da vida, por guiar meus passos e iluminar meus caminhos. Agradeço pelos bons momentos que me fizeram celebrar a vida, e pelos obstáculos, que a todo o momento me fazem evoluir.

À minha amada mãe, **Isolete**, minha grande amiga, meu maior exemplo de determinação, meu porto seguro! Muito obrigado pela paciência, cuidado, amor, proteção e por todo o apoio perante minhas escolhas e nas dificuldades, me dando forças para continuar!

Ao meu amado pai, **José Osvaldo**, pelo exemplo de homem trabalhador, responsável e honesto. Muito obrigado por contribuir com a formação da minha essência, do meu caráter e oportunizar a realização deste sonho.

Ao meu orientador Professor **César Augusto Magalhães Benfatti**, agradeço imensamente pela oportunidade de iniciar no meio científico; pela confiança em mim depositada para a execução deste trabalho; pelo constante incentivo à pesquisa e busca por novos aprendizados. Serei eternamente grato pela tua amizade, pelos conselhos nos momentos de tribulação, por toda a preocupação e ajuda nos momentos mais difíceis. Muito obrigado!

Ao Dr. **Ricardo de Souza Magini**, que viabilizou a execução deste trabalho através da junção de seus conhecimentos e descobertas. Muito obrigado por dividir comigo tanto aprendizado!

Ao **Abraão Moratelli Prado**, que dividiu alegremente comigo suas experiências laboratoriais. Tua presença foi imprescindível para o início deste trabalho. Muito obrigado por toda a ajuda, pelas instruções e pela paciência!

Ao **Jair Rodrivich**, agradeço pela ajuda com as fotografias na intervenção cirúrgica e por transmitir tanta calma e tranquilidade.

Ao **Orestes Pereira, Manuela Lebarbenchon e Ricardo Pezzini**, por todo o auxílio e colaboração durante a execução do experimento. Muito obrigado pelo apoio!

Ao Professor **Adair Roberto Soares dos Santos**, pelo acolhimento e por abrir portas do LANDI, muito obrigado!

*Só é digno da liberdade, como da vida, aquele
que se empenha em conquistá-la”*

(Johann Goethe)

RESUMO

Uma situação corriqueira na clínica odontológica é a presença de recessões e de depressões vestibulares, e a ausência de mucosa queratinizada que trazem problemas estéticos e funcionais, os quais dificultam a manutenção da higiene por parte do paciente. Várias técnicas tem sido introduzidas com a finalidade de aumentar ou criar uma faixa adequada de mucosa. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vivo* a resposta cicatricial do organismo de ratos a um enxerto de fibroblastos gengivais provenientes de cultura primária associada ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a uma matriz de celulose bacteriana ou matriz dérmica acelular. Para tal foram utilizados 44 animais da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus albinus*) adultos machos, onde foram operados a área de mucosa jugal bilateral aleatoriamente, divididos em 06 grupos, grupo 1 (n=14) onde foi realizado apenas defeito na área operada (controle negativo), grupo 2 (n=9) onde foi realizado enxerto gengival livre de área doadora do palato, grupo 3 (n=13) realizado colocação de celulose bacteriana na região operada, e grupo 4 (n=6), foi realizado colocação de matriz dérmica acelular (SureDerm[®]) na região operada, grupo 5 (n=10), celulose bacteriana associada à cultura primária de fibroblastos e grupo 6 (n=6), matriz dérmica acelular associada à cultura primária de fibroblastos. Distribuídos aleatoriamente e operados de maneira randômica no período experimental de 15 dias, os animais foram anestesiados para a análise clínica e realização de biópsias excisionais das áreas operadas. As amostras removidas de região de mucosa jugal foram fixadas, destinadas ao processo histológico e incluídas em parafina. Os cortes de 5 µm de espessura foram coradas com Hematoxilina-Eosina e as lâminas histológicas analisadas de maneira qualitativa através da microscopia de campo claro. As amostras celulares foram removidas na 6ª passagem. Foram avaliados clinicamente para todos os grupos: presença clínica de queratina; presença clínica de tecido granulomatoso; presença de ulceração; continuidade do epitélio; regularidade do epitélio; presença clínica de rubor; presença clínica de edema; presença visível do arcabouço. Foram avaliados histologicamente para todos os grupos: presença de crista epitelial; interrupção na continuidade do epitélio; espessura do epitélio; camada de queratina; presença de infiltrado inflamatório no conjuntivo; características do conjuntivo, rico em fibras ou rico em células; presença de vasos sanguíneos, dilatados ou normais; áreas de

hemorragias. Os resultados clínicos sugerem o que o grupo 6 teve melhor cicatrização, tendo aspectos semelhantes ou superiores ao grupo controle positivo. Os resultados histológicos sugerem que o grupo 6 teve boa resposta, porém todos os grupos foram similares entre si. Concluímos que o grupo 6 apresentou os melhores aspectos de cicatrização desta pesquisa, porém estudos futuros são necessários para utilização clínica em humanos destas técnicas de engenharia tecidual reconstrutivas.

Palavras-chave: Cultura de fibroblastos; enxerto gengival livre; celulose; matriz dérmica celular.

ABSTRACT

A routine situation in the odontological clinic is the presence of recessions and vestibular depressions, and absence of keratinized mucosa that bring aesthetic and functional problems, which hamper the maintenance of hygiene on the part of the patient. Several techniques have been introduced with the purpose of increasing or create a proper range of mucosa. The objective of this work was to evaluate the *in vivo* cicatricial response of the rats organism to a gingival fibroblasts graft from primary culture associated with the use of platelet-rich plasma (PRP) associated with a bacterial cellulose matrix or acellular dermal matrix. For such, 44 Wistar lineage (*Rattus norvegicus albinus*) animals were used, adult males, where the area of bilateral jugal mucosa was randomly operated, divided in 06 groups, group 1 (n=14) where only defect in the operated area was performed (negative control), group 2 (n=9) where free gingival graft from the palate was performed, group 3 (n=13) where placement of bacterial cellulose in the operated region was performed, and group 4 (n=6), performed placing acellular dermal matrix (SureDerm®) in the operated region, group 5 (n=10), bacterial cellulose associated to primary culture of fibroblasts and group 6 (n=6), acellular dermal matrix associated to primary culture Of fibroblasts. Randomly distributed and operated in the experimental period of 15 days, the animals were anesthetized for clinical analysis and excisional biopsy of the operated areas. The samples removed from the region of jugal mucosa were fixed, intended for the histological process and included in paraffin. The 5 µm thick sections were stained with Hematoxylin-Eosin and the histological slides analyzed qualitatively through the clear field microscopy. All groups were clinically evaluate on: clinical presence of keratin; clinical presence of granulomatous tissue; presence of ulceration; continuity of epithelium; regularity of epithelium; clinical presence of redness; clinical presence of edema; visible presence of the scaffold. All groups were evaluated histologically for: presence of the epithelial crest; interruption in the continuity of the epithelium; thickness of epithelium; keratin layer; presence of inflammatory infiltrate in the connective tissue; characteristics of connective tissue, rich in fibers or rich in cells; presence of blood vessels, dilated or normal; areas of hemorrhages. The clinical results suggest that group 6 had better healing, with aspects similar or superior to that of the positive control group. The

histological results suggest that the group 6 had good response, but all groups were similar between themselves. We concluded that the group 6 presented the best healing aspects of this research, but further studies are needed for clinical use of these reconstructive tissue-engineering techniques in humans.

Key words: The fibroblast culture; free gingival graft; cellulose; dermal cellular matrix.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Defeito criado em mucosa jugal esquerda em um dos animais devidamente anestesiados.....	55
Figura 2 - Após criado o defeito, o recobrimento era realizado de acordo com o respectivo grupo. Ilustração do enxerto gengival livre proveniente do palato duro (grupo 2).....	56
Figura 3 - Após criado o defeito, o recobrimento era realizado de acordo com o respectivo grupo. Ilustração do enxerto de celulose bacteriana (grupo 3).	56
Figura 4 - Imagem clínica do grupo controle sem recobrimento após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.....	60
Figura 5 - Imagem clínica do grupo controle com enxerto gengival livre após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.....	61
Figura 6 - Imagem clínica do grupo com recobrimento com celulose bacteriana após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.	62
Figura 7 - Imagem clínica do grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.	63
Figura 8 - Imagem clínica do grupo controle com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.....	65
Figura 9 - Imagem clínica do grupo controle com recobrimento com matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.....	66
Figura 10 - Lâmina histológica do grupo no qual foi mantido defeito sem recobrimento.....	69

Figura 11 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento utilizando enxerto gengival livre proveniente do palato.	71
Figura 12 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com celulose bacteriana.....	73
Figura 13 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular.....	75
Figura 14 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos.	77
Figura 15 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos.	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas mais comuns das amostras dos grupos respectivos.....	67
Tabela 2 - Características histológicas mais comuns das amostras dos grupos respectivos.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADM - Matriz dérmica acelular
BC - Celulose bacteriana
CO₂ - Gás carbônico
cm² - Centímetros quadrados
DNA - Ácido Desoxirribonucleico
h - Horas(s)
H & E - Hematoxilina e Eosina
IL - Interleucina
LANDI - Laboratório de Neurobiologia da Dor e Inflamação
LP - Ligamento Periodontal
ml - Mililitro
ml/cm² - (Mililitro por centímetro quadrado)
mg - Miligrama
mg/kg - Miligrama por kilograma
min - Minuto(s)
NGF - Fator de crescimento neural
O₂ - Oxigênio
pH - potencial Hidrogeniônico
PRP - Plasma rico em plaquetas
SFB - Soro Fetal Bovino
TNF - Fator de necrose tumoral
UFSC - Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

® - Marca Registrada

°C - Grau Celsius

± - Mais ou menos

% - Por cento

nº - Número

µm - Micrômetros

X - Vezes

= - Igual

< - Menor

> - Maior

µg - Micrograma

µl - Microlitro

α - Alfa

β - Beta

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	27
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	31
2.1	IMPORTÂNCIA DA MUCOSA QUERATINIZADA EM TECIDOS PERI-IMPLANTARES.....	31
2.2	ENXERTO GENGIVAL LIVRE	33
2.3	MATRIZ DÉRMICA ACELULAR	35
2.4	CELULOSE BACTERIANA	36
2.5	ENGENHARIA TECIDUAL.....	37
2.6	CULTURA CELULAR.....	39
2.7	MEIO DE CULTURA	42
2.8	ESTUDOS REALIZADOS <i>IN VITRO</i> COM FIBROBLASTOS.....	43
2.9	PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)	46
2.9.2	Processo de obtenção	47
2.9.3	Técnica de aplicação clínica	47
3	OBJETIVOS.....	49
3.1	OBJETIVO GERAL.....	49
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	SELEÇÃO DA AMOSTRA	51
4.2	PROFILAXIA ANTIBIÓTICA	51
4.3	PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS.....	51
4.4	COLETA DO TECIDO AUTÓGENO.....	51
4.5	OBTENÇÃO DO PRP	52
4.6	CULTURA PRIMÁRIA	53
4.7	PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE ENXERTO	55
4.8	CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS.....	57
4.9	AVALIAÇÃO CLÍNICA E OBTENÇÃO DAS PEÇAS.....	57
4.10	PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....	57
4.11	ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA.....	57
5	RESULTADOS	59
5.1	ANÁLISE CLÍNICA.....	59
5.1.1	Grupo controle sem recobrimento	59
5.1.2	Grupo controle com enxerto gengival livre	60
5.1.3	Grupo com recobrimento com celulose bacteriana	61

5.1.4 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (surederm)	62
5.1.5 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos.....	64
5.1.6 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (surederm) associada à cultura primária de fibroblastos	65
5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA	68
5.2.1 Grupo controle sem recobrimento	68
5.2.2 Grupo controle com enxerto gengival livre	70
5.2.3 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana ..	71
5.2.4 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (surederm)	74
5.2.5 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos.....	76
5.2.6 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (surederm) associada à cultura primária de fibroblastos	78
6 DISCUSSÃO	81
7 CONCLUSÃO.....	87
REFERÊNCIAS	89
ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – UFSC).	

1 INTRODUÇÃO

Uma situação corriqueira na clínica odontológica é a presença de recessões e de depressões vestibulares, e a ausência de mucosa queratinizada, que trazem problemas estéticos funcionais e dificultam a manutenção da higiene por parte do paciente. Nessas situações, enxertos de tecido mole autógeno (conjuntivo subepitelial, epitélio conjuntivo) são também o padrão-ouro de escolha e podem ser obtidos do palato, de áreas edêntulas e da região retromolar (CLAVERO e LUNDGREN, 2003).

Várias técnicas têm sido introduzidas na literatura com a finalidade de aumentar/criar uma faixa adequada de mucosa queratinizada (BROOME, 1976; CAFFESSE, 1978; CALLAN, 1998; DORFMAN, 1980; EDEL, 1975; HAERI, 1999; NABERS, 1954), dentre as quais a do enxerto gengival livre autógeno, de tecido epitelial e conjuntivo e somente de tecido conjuntivo. Entretanto, é necessária uma área doadora intraoral para a remoção do tecido autógeno podendo ser o palato duro, as áreas de rebordo edêntulo, a região retromolar e tecidos removidos de áreas de gengivectomias ou gengivoplastias.

A utilização de tecido autógeno pode trazer desconforto adicional ao paciente, já que há duas áreas cirúrgicas, riscos de acidentes hemorrágicos nas áreas doadoras, dificuldade de padronização da espessura do tecido, diferença de cor/espessura que podem resultar em alterações estéticas nas áreas receptoras e, nos casos com várias áreas que necessitam de intervenção cirúrgica, há a necessidade de grande disponibilidade de tecido doador aumentando os riscos relatados (BREAUKT, 1999; HALL, 1977; SILVERSTEIN, 1996, 1997; SULLIVAN, 1968).

Para minimizar essas desvantagens, pesquisadores têm tentado desenvolver produtos que substituam o tecido autógeno. Inicialmente, testaram-se os enxertos de pele desidratada e liofilizada, porém, a longo prazo o processo de liofilização resultava em resposta inflamatória de corpo estranho (SULLIVAN, 1968). Mais recentemente, desenvolveu-se uma técnica de processamento, resultando em uma matriz acelular estruturalmente intacta, sendo composta principalmente de colágeno e elastina. Como não possui células, nem fragmentos das mesmas, esse tecido não contém antígenos Classe I e HALD, tornando-o biocompatível e sem riscos de transmitir doenças virais.

Entre esses arcabouços disponíveis, será utilizado uma membrana de Celulose Bacteriana (BC) e uma membrana dérmica acelular SureDerm (ADM). BC e SureDerm tem sido desenvolvida e utilizada para diversas aplicações médicas, especialmente como curativo de ferimentos e substituto temporário de pele no tratamento de lesões, queimaduras, úlceras e enxertos, e como auxiliar em abrasões dérmicas (FONTANA et al., 1990; SANCHAVANAKIT et al., 2006; ZHANG et al., 2009; FENG et al., 2014). Ao aplicar a matriz em diferentes cicatrizações de feridas, elas costumam atuar como suporte para infiltração celular e entram em processo de remodelação progressiva, formando tecido funcional sem resposta imunológica do organismo (RENNERT et al., 2013).

Dentro do processo de evolução dos tratamentos reconstrutivos, sejam eles de tecido duro ou de tecido mole, encontra-se a engenharia tecidual (UEDA, 2000). Tal técnica consiste na produção de um tecido no meio extracorpóreo e em sua implantação no indivíduo. A utilização da engenharia tecidual está diretamente relacionada a três bases de uma tríade: a) o cultivo de células capazes de produzir o tecido que desejamos reconstruir, ou células capazes de se diferenciar em tipos específicos (células-tronco), células essas que, no caso dos tecidos orais periodontais e peri-implantares, são, principalmente, os fibroblastos e os osteoblastos; b) fatores de crescimento que irão guiar a diferenciação/proliferação dos vários tipos celulares, além de permitir a vascularização do material implantado; e c) um arcabouço de material absorvível capaz de armazenar tanto a cultura de células quanto esses fatores de crescimento (MUSCHLER, NAKAMOTO e GRIFFITH, 2004).

As técnicas que envolvem cultura celular são eficientes e indispensáveis para a avaliação da efetividade bases desta tríade. Esse tipo de estudo tem como principal vantagem a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a tensão de CO₂ e de O₂ e a pressão de CO₂ podem ser controlados de maneira facilitada e eficiente. Além dessa vantagem, o modelo de estudo de cultura de células possibilita a obtenção de culturas idênticas e tem um custo baixo quando comparado com estudos *in vivo* (FRESHNEY, 1990).

Todos os procedimentos de cultura primária de fibroblastos realizados nesta pesquisa serão baseados na dissertação “Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos da gengiva humana. Avaliação da

viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA” (COURA, 2004).

No meio de cultura dos fibroblastos não será utilizado o Soro Fetal Bovino (SFB) preconizado no trabalho de Coura. Em contrapartida, será utilizado Plasma Rico em Plaquetas (PRP) que apresentou bons resultados no crescimento e manutenção estável da linhagem de células testadas na dissertação “Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – Estudo *in vitro*” (FILHO, 2002).

O objetivo deste trabalho foi avaliar clinicamente, e histologicamente em análise qualitativa, através de estudos em ratos, o comportamento cicatricial com relação à enxerto de fibroblastos gengivais provenientes de cultura primária associada ao uso de plasma rico em plaquetas (PRP) associado a uma matriz de celulose bacteriana e matriz dérmica acelular, de arcabouços de celulose bacteriana e matriz dérmica acelular (SureDerm[®]) sem cultura primária, utilizando grupos controles positivo (enxerto autólogo) e controle negativo (cicatrização por segunda intenção), e assim elencar quais dessas membranas podem ser usadas em futuras aplicações clínicas para a engenharia de tecido mole, tanto para reconstruções ao redor de dentes, quanto ao redor de implantes.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O sucesso a longo prazo e estabilidade na função e estética em interfaces de dentes e implantes está diretamente correlacionado com a presença de tecido mole saudável ao redor dos mesmos. A ausência de tecido queratinizado pode facilitar agregação de placa bacterina ao redor de dentes e implantes, além de levar a recessão da margem gengival em regiões estéticas. O periodonto mais espesso é menos propenso a essas reações, estendendo-se também para os implantes dentários, onde afirma-se que a presença de gengiva está fortemente correlacionado com saúde ideal dos tecidos moles e duros (KENNEDY et al., 1985; WENNSTROM et al., 1983; BLOCK et al., 1990).

Hoje em dia, os implantes funcionalmente carregados em um estado adequado de saúde e estética tornou-se um pré-requisito para o sucesso a longo prazo de restauração do implante, sendo cada vez mais preocupante a necessidade do tecido queratinizado ao redor do implante para manter estabilidade e saúde do tecido (CHIU et al, 2015).

Com o objetivo de melhorar tanto o volume de tecido queratinizado quanto o contorno dos tecidos moles em torno de dentes e implantes, vários procedimentos foram desenvolvidos. (GEORGE et al., 2015). Enxertos autógenos utilizando enxerto gengival livre e enxerto de tecido conjuntivo tem sido amplamente usado com bons resultados clínicos (CAIRO; PGLIARO; NIERI, 2008; CANEVA et al, 2013).

Como alternativa a esses procedimentos que demandam um sítio doador, gerando morbidade e desconforto ao paciente, temos algumas opções de materiais halogênicos, como a matriz dérmica acelular, inicialmente usada para cobrir queimaduras e depois introduzida para aumentar mucosa queratinizada (WILSON; MCGUIRE; NUNN, 2005). No entanto, a celulose bacteriana, que também vem sendo utilizada na medicina para uma série de indicações, na odontologia são aplicadas para recuperação de tecido periodontal (JONAS; FARAH, 1998; GALGUT, 1990), tornando-se uma potencial alternativa para necessidade de ganhos de tecido moles ao redor de dentes e implantes.

2.1 IMPORTÂNCIA DA MUCOSA QUERATINIZADA EM TECIDOS PERIODONTAIS E PERI-IMPLANTARES

Após a extração de um determinado elemento dental, ocorre a reabsorção de tecido ósseo e gengiva queratinizada circundante,

podendo ocorrer deficiência na mucosa durante a colocação de um implante subsequente, havendo assim a necessidade de criação de um tecido conjuntivo denso em torno do implante (MCKINNEY et al, 1988; SCHROEDER et al, 1981; BRÄNEMARK et al, 1969).

Warrer e colaboradores (1995) realizaram um estudo com macacos onde verificou-se que a deficiência em mucosa queratinizada ao redor de implantes demonstrou mais recessão dos tecidos moles e uma maior perda de inserção. Segundo Mombelli (2000) a boa higiene bucal é um fator importante na manutenção da saúde peri-implantar e redução do risco de doença peri-implantar. Buyukozdemir Askin e colaboradores (2015) mostraram que o grupo com estreita mucosa queratinizada teve melhora significativa no índice de placa após o procedimento de enxertia gengival.

De acordo com Salvi e Lang (2004), os parâmetros clínicos comumente usados para monitorar o estado do tecido mole peri-implantar são inflamação dos tecidos moles peri-implantares, recessão do tecido marginal, profundidade de sondagem e nível de inserção. Os sinais clínicos de sangramento à sondagem, recessão da mucosa, aumento a profundidade de sondagem e perda de nível de inserção estão sempre presentes em peri-implantantites (HEITZ-MAYFIELD, 2008).

Segundo Bouri Jr e colaboradores (2008) os locais de mucosa queratinizada estreita ao redor de implantes (<2mm) teve uma chance significativamente maior de hemorragia do que locais com ampla mucosa queratinizada (>2mm). Porém estudos de Kim e colaboradores (2009) apontaram que houve diferença insignificante de sinais de inflamação entre os grupos de mucosas queratinizadas estreitas e largas, onde a quantidade da mucosa queratinizada tem pouca influência sobre a inflamação na presença de uma boa higiene oral.

Estudos realizados por Kim e colaboradores (2009) apontaram que a quantidade de recessão gengival aumentou significativamente nos locais de implante com estreita mucosa queratinizada. Além da mucosa queratinizada, o biótipo dos tecidos moles, o nível da crista óssea, a profundidade da plataforma do implante e a posição vestibular do implante influenciam no nível de recessão gengival (ZIGDON; MACHTEI, 2008)

Uma mucosa queratinizada, onde proporciona um colar de tecido conjuntivo denso, pode estabelecer uma vedação mais eficiente do tecido mole em torno dos implantes (MOON et al, 1999). Implantes com faixa mais ampla da mucosa queratinizada apresentaram com maior

média de profundidade de sondagem do que aqueles com faixa estreita de mucosa, onde consideraram que a sondagem mais rasa nas mucosas mais estreitas pode estar relacionado com a recessão dos tecidos moles, logo menos formação de bolsa pode ser mais comum em áreas de menor quantidade de mucosa queratinizada (ZIGDON; MACHTEI, 2008; ADIBRAD; SHAHABUEI, SAHABI, 2009).

Em relação a influência da mucosa queratinizada sobre o estado do tecido ósseo, Adibrad e colaboradores (2009) não observaram diferença significativa na perda de crista óssea entre os grupos de mucosas queratinizadas estreitas ou largas. No entanto, Bouri Jr e colaboradores (2008) avaliaram maior perda óssea média para os implantes com estreita faixa de mucosa queratinizada. O nível ósseo em torno dos implantes é afetado por múltiplos fatores, incluindo habito do paciente fumar, desenho do implante, qualidade e quantidade do tecido celular circundante, procedimentos cirúrgicos, carga oclusal, bem como outros fatores, sendo difícil tomar conclusões do efeito da mucosa peri-implantar no nível ósseo peri-implantar (CHUNG et al, 2007).

2.2 ENXERTO GENGIVAL LIVRE

A utilização de um enxerto de tecido mole livre é indicada por exigências estéticas com o propósito de estabelecer uma harmonia em relação à saúde, altura, volume, cor e os contornos da gengiva com a dentição circundante, além de casos onde exista a dificuldade de remoção de placa bacteriana de forma eficiente ao redor de dentes e implantes cercados por mucosa fina, resultando em recessão. Controlar a inflamação do tecido é necessária para manter os níveis de fixação, apesar da largura dos tecidos queratinizados circundantes (DORFMAN; KENNEDY; BIRD, 1982).

Quando o objetivo consiste em somente aumentar a quantidade de tecido queratinizado, a técnica mais adequada permanece em enxerto gengival livre, quando também é desejado cobertura de raiz exposta, enxerto de tecido conjuntivo fornece resultados mais previsíveis (JAHNKE et al, 1993).

O enxerto gengival livre autógeno pode ser dividido de acordo com a espessura do tecido doador em 3 categorias: Fina (0,5-0,8mm), média (0,9-1,4mm) e grossa (1,5 a >2mm). O enxerto fino oferece melhor combinação de cores, cura mais rapidamente, tem área doadora rasa, porém deve ser evitada sobre superfície radicular exposta

(SULLIVAN; ATKINS, 1968; RATEITSCHAK; EGLI; FRINGELI, 1979). O enxerto de espessura média é indicado para todos os tipos de enxertia, menos para cobertura de raiz, a área doadora é mais profunda, o que pode causar mais complicações após a cirurgia. O enxerto gengival livre grosso pode ser usado para cobrir superfícies de raízes expostas, são mais resistentes a futuras recessões, porém tem aparência estética menos favoráveis por causa da cor e espessura incompatíveis com a gengiva adjacente (MILLER, 1985; MATTER; CIMASONI, 1976).

Entre as possíveis indicações para o uso de enxerto gengival livre estão aumento de dimensões gengivais, eliminação de freio, aumento da profundidade vestibular, melhoria de fatores anatômicos locais associados com a posição dos dentes, raízes proeminentes com deiscência e estabilização de recessão gengival progressiva (LANGER; CALAGNA, 1978). Apesar de sua capacidade de cobertura de raiz, o enxerto gengival livre não é adequado para áreas com exigência estética, pois o tecido enxertado mantém suas características do seu local doador, podendo afetar a estética da região (KARRING; OSTERGAARD; LOE, 1971; KARRING, LANG; LOE, 1975).

Bengazi et al (2013) realizou um estudo em cachorros onde estudou as alterações dimensionais em implantes orais seguinte de colocação de enxerto gengival livre em mucosa unicamente alveolar. Concluiu que o aumento da espessura da mucosa alveolar por meio de enxerto gengival livre em regiões sem mucosa queratinizada foi semelhante aos resultados dos implantes cercados com mucosa mastigatória, reduzindo a reabsorção esperada na crista óssea marginal e recessões gengivais.

Segundo Camargo (2000) existem duas situações clínicas em que o enxerto gengival livre tem vantagens sobre o enxerto conjuntivo subepitelial para cobertura de raiz, onde ambas têm a necessidade de um aumento na dimensão gengival apicocoronal. A primeira situação corresponde a zonas que apresentam diminuição da profundidade vestibular, onde utilizando enxerto gengival livre tem-se resultados mais favoráveis, assegurando o desenvolvimento de uma faixa adequada de gengiva em anexo.

A segunda situação é quando se deseja cinco milímetros de tecido queratinizado para evitar a recessão nas áreas onde uma restauração com margens subgengivias está prevista (MAYNARD; WILSON, 1979). Problemas incluindo a cobertura das superfícies das raízes expostas

anteriormente pode ser alcançado pelo enxerto gengival livre, pois permite um grande aumento apicocoronal da mucosa queratinizada.

2.3 MATRIZ DÉRMICA ACELULAR

A preparação deste enxerto dérmico é realizada pela remoção do componente celular e preservação da integridade ultra-estrutural, onde se danificada induziria uma resposta inflamatória. A matriz dérmica acelular é processada a partir da pele do doador humano obtido a partir de bancos de tecidos aprovados, onde o tecido é preparado pela remoção dos componentes celulares e epiderme da pele, o restante então é crioprotégido e rapidamente liofilizadas em um processo patenteado para preservar a integridade bioquímica estrutural (WAINWRIGHT, 1995; 1996; RHEE et al, 1998).

A matriz dérmica acelular foi originalmente utilizada para o uso em cirurgia plástica para o tratamento de queimaduras (WAINWRIGHT, 1995). Na medicina seu uso vem se expandindo para incluir reconstrução de membrana timpânica, reconstrução nasal (BENECKE, 2001; KRIDEL; FODA; LUNDE, 1998), tratamento de atrofia dérmica (FISCHER; FRODEL, 1999), reparação de fístulas (GIRARD; SIDEMAN; SPAIN, 2002) e aplicações em cirurgia estética facial (CASTOR; TO; PAPAY, 1999). Nos últimos anos vários estudos tem avaliado o efeito da matriz dérmica acelular para a cirurgia periodontal com resultados promissores. A maioria dos estudos incluiu um pequeno tamanho da amostra onde não tinha valor estatístico o suficiente para tirar conclusões sobre a sua eficácia (HARRIS, 2000; 2001; 2002; 2004; TAL, 1999; 2002; WEI, 2000; 2002).

Shulman (1996) foi o primeiro autor a documentar o uso da matriz dérmica acelular em odontologia. A partir de então, a matriz dérmica acelular vindo sendo utilizada em várias aplicações, como aumento de tecido mole, aumento de gengiva queratinizada, como membrana de barreira, como material de enxertia para cobrir tatuagem de amalgama e procedimentos de cobertura de raiz exposta (FOWLER; BREAUULT, 2001; WEI et al, 2000; NOVAES JUNIOR et al, 2002).

Aloenxertos como matriz dérmica acelular tem sido utilizados ao redor de dentes e implantes para substituir os enxertos autógenos de tecido conjuntivo, principalmente para locais de recepção maiores ou quando a obtenção de tecido autógeno não é viável e levaria a um desconforto pós-operatório exacerbado (HIRSCH et al, 2005; FU; SU;

WANG, 2012). Apesar de aloenxertos e autotransplante possuírem previsibilidade semelhante para técnicas de recobrimento radicular, autotransplante de tecido conjuntivo resulta uma cobertura superior ao defeito, com maior ganho de tecido queratinizado e profundidades de sondagens residuais inferiores (HARRIS, 2002; 2004).

Os aloenxertos também se apresentam como uma alternativa para substituir um enxerto gengival livre. Wei e colaboradores (2000; 2002) realizaram um estudo comparando a matriz dérmica acelular e enxerto gengival livre comparando-as em relação ao aumento da faixa de gengiva inserida. Os resultados sugeriram que o tecido do local formado com matriz dérmica acelular era semelhante a um tecido cicatricial.

2.4 CELULOSE BACTERIANA

A celulose bacteriana é um tipo de polissacarídeo extracelular presente no biofilme produzido por várias bactérias. Este polímero é altamente cristalino e o grau de cristalinidade varia de acordo com a origem e modo de tratamento químico (GEORGE et al, 2005). Celulose bacteriana é composta por moléculas de glicose e seu processo de biossíntese envolve várias etapas reguladas por um indivíduo e caracterizado por enzimas e proteínas complexas (BROWN; WILLISON; RICHARDSON, 1976; ROSS; MAYER; BANZIMAN, 1991).

A celulose bacteriana é utilizada em uma vasta gama de aplicações, como a indústria de dispositivos de electroacústica e diafragmas de telefone. É potencialmente adequada como carreadores em engenharia de tecidos, devido as suas propriedades únicas, como retenção de água elevada, rede fibrosa fina, permite crescimento e proliferação celular e resistente a tração e baixo custo de produção. Em medicina, são utilizadas como revestimentos de stents, por substituição de dura-máter, em casos de tumores ou traumas ou como proteção para pele em casos de queimaduras (SVENSSON et al, 2005; BÄCKDAHL et al, 2006; WATANABE; TABUCHI, 1998; FONTANA et al, 1990; PITANGUY; SALGADO; MARACAJA, 1988).

Em odontologia, a celulose bacteriana vem sendo utilizada para recuperação de tecido periodontal. Gengiflex® é uma membrana de celulose na qual foi desenvolvida para recuperar tecidos periodontais pela separação de células epiteliais e tecido conjuntivo gengival em

tratamentos de superfícies radiculares expostas. (NOVAES; NOVAES, 1990, 1992, 1993).

Galgut (1990) realizou um estudo clínico onde avaliou a cicatrização do tecido periodontal em áreas de defeito, utilizando celulose oxidada biodegradável com a técnica de regeneração guiada dos tecidos. O autor observou boa cicatrização em todos os indivíduos, com ausência de defeitos deletérios onde foi colocada a malha. Não observou diferenças significativas, acreditando que as diferenças eram atribuídas as diferentes formas de cicatrização entre os indivíduos. Este estudo não ocorreu investigação histológica, necessitando de novos estudos onde possivelmente irá determinar a resposta tecidual.

2.5 ENGENHARIA TECIDUAL

A engenharia tecidual caracteriza-se pelo desenvolvimento e manipulação de moléculas, células, tecidos ou órgãos para o restabelecimento da função de partes do corpo injuriadas ou defeituosas. Atualmente, concomitante aos avanços associados na medicina de transplantes, genética, engenharia biomédica e na engenharia de órgãos, a engenharia tecidual oferece a possibilidade de regeneração verdadeira, essencial para as estruturas humanas danificadas (ASSAEL, 2003). Dessa forma, as estratégias da engenharia tecidual, através do cultivo celular humano para aplicação clínica, estão sendo desenvolvidas em diferentes especialidades médicas para reposição de cartilagens, ossos, componentes cardiovasculares e pele. (MALEKZADEH et al., 1998).

Segundo Ueda et al. (2000), os elementos necessários para a aplicação dos princípios da engenharia de tecidos estão baseados na tríade: (1) cultivo de células apropriadas (fibroblastos, osteoblastos, células-tronco, entre outras); (2) matrizes (arcabouços ou "scaffolds") confeccionadas em colágeno, osso ou polímeros sintéticos e; (3) adição de mediadores solúveis, como fatores de crescimento e adesinas. As matrizes podem ter várias origens, como os polihidroxialcanoatos, tais como o ácido polilático, ácido poliglicólico, policaprolactona (PEGO et al., 2003), hidrogéis à base de colágeno, polissacarídeos, ou ambos, tais como o alginato e a quitosana (LEE et al., 2000; PIEPER et al., 1999). As matrizes devem apresentar integridade estrutural para que novos tecidos se desenvolvam (LEE et al., 2000; STAMMEN et al., 2001).

A engenharia tecidual aponta para o reparo de tecidos e órgãos danificados, porém, não causa respostas imunológicas ou infecções, não

necessita do uso de cadáveres e, principalmente, não mutila outras regiões do paciente. O cultivo de células é normalmente realizado em placas ou garrafas contendo meios de cultura que fornecem nutrientes para a viabilidade celular, *in vitro*. A dificuldade de transporte das células para um sítio receptor de um ser humano baseia-se no aspecto bidimensional que caracteriza a cultura, devido as células propagadas formarem uma monocamada nas placas ou garrafas de culturas. Os carreadores, que fornecem um aspecto tridimensional para cultura e proliferação celular, têm sido utilizados para apoio e invasão dos fibroblastos (ZACCHI et al., 1998).

O cultivo de fibroblastos em matrizes biocompatíveis pode ser uma opção nas terapias periodontais e periimplantares, que necessitam de aumento de tecido gengival. Grande parte dos procedimentos cirúrgicos periodontais e perimplantares reconstrutivos necessita de áreas doadoras intrabucais de tecido mole, com a remoção de tecido doador do palato, áreas edêntulas, túber, ou ambas. Tais procedimentos resultam em um pós-operatório doloroso e aumento do tempo cirúrgico (PINI PRATO et al., 2000).

A reposição do aparato periodontal através do cultivo celular mostra-se promissora. Pini Prato et al. (2000) relataram o caso de uma paciente que necessitou de procedimento cirúrgico periodontal para reposição de mucosa queratinizada previamente à reabilitação protética. Essa deficiência foi tratada por meio de técnicas de engenharia tecidual, que compreenderam o cultivo primário de fibroblastos, a partir da remoção cirúrgica de uma biópsia gengival de aproximadamente 2mm². Esses fibroblastos foram cultivados em uma matriz, uma membrana de ácido hialurônico, que foi transportada para o sítio receptor da paciente. Os autores conseguiram êxito na obtenção de mucosa queratinizada, confirmado através de análise macroscópica e histológica. Portanto, a possibilidade de obtenção de tecido através da cultura de células, *in vitro*, com utilização de carreadores pode diminuir o trauma e o tempo cirúrgico. Pini Prato et al. (2003) relataram o sucesso da técnica em 6 pacientes tratados através da engenharia de tecidos.

Lauer e Schimming (2001) apresentaram em seu trabalho a utilização de enxertos de mucosa oral através da engenharia de tecidos, utilizando-se células provenientes do palato duro. O estudo apresentou os resultados clínicos dos procedimentos cirúrgicos de enxertia de mucosa oral em vestibulo após ressecção tumoral em 6 pacientes. Concluíram, a partir de evidências clínicas e imuno-histológicas, que o

enxerto autógeno de mucosa oral, obtido por meio de engenharia de tecidos, pode ser utilizado para a cobertura de feridas na cavidade oral.

Cicatrização tecidual completa e diferenciação epitelial normal puderam ser observadas na área enxertada em um período pós-cirúrgico de 6 meses. Bordner e Grossman (2003) relataram o sucesso do uso de enxertos de mucosa em 11 pacientes, por meio de culturas autólogas de células da mucosa oral. Após 3 (três) semanas da colocação dos enxertos de mucosa cultivada, os sítios apresentaram-se ceratinizados e sem sinais de infecção. Foi encontrada uma mucosa saudável depois de 3 (três) meses. Os autores concluíram que os enxertos de mucosa cultivada são úteis em grandes defeitos da mucosa oral, principalmente após as patologias.

A aplicação de enxertos de mucosa oral gerada, *in vitro*, em defeitos da cavidade oral (LANGDON et al., 1991), em cirurgias periimplantares (UEDA et al., 1998), em procedimentos protéticos (BORDNER; GROSSMAN, 2001) e em vestibuloplastias (RAGHOEBAR et al., 1995) tem sido utilizada com sucesso.

2.6 CULTURA CELULAR

A cultura de tecidos foi desenvolvida no início do século passado (HARRISON, 1907; CARREL, 1912) como um método para estudo do comportamento das células animais, eliminando as possibilidades de variações sistêmicas que podem acontecer em um estado fisiológico normal ou em condições de estresse, oriundas de um experimento. A técnica foi elaborada inicialmente através da fragmentação de tecidos, crescimento e migração celular ao redor dos fragmentos por meio de mitoses celulares.

O termo cultura de tecidos foi usado de uma maneira abrangente, no entanto, a cultura de tecidos inclui a cultura de órgãos e de células. A cultura de órgãos implica em uma cultura tridimensional de tecidos desagregados que permanece com algumas ou todas as características histológicas daquele tecido, *in vivo*. A cultura celular refere-se às culturas derivadas pela dispersão de células retiradas de um tecido original, de uma cultura primária ou de uma linhagem celular, pela desagregação enzimática, mecânica ou química. O termo cultura histotípica refere-se às células associadas em uma estrutura tridimensional, ou seja, o crescimento de uma monocamada celular, a agregação em suspensão ou a infiltração em uma matriz tridimensional,

como o gel de colágeno. O termo organotípico implica nesses mesmos procedimentos, porém, utiliza células recombinantes de diferentes linhagens.

Harrisson (1907) escolheu os sapos como fonte de tecidos, provavelmente por apresentarem sangue frio, assim, a incubação não seria um requisito necessário. Adicionalmente, a regeneração tecidual é mais comum em pequenos vertebrados e isso poderia ser vantajoso em estudos, *in vitro*. Embora essa técnica pudesse reluzir uma nova perspectiva de interesse nos estudos de cultura de tecidos, *in vitro*, poucos pesquisadores seguiram esse exemplo na seleção de espécies. A ciência médica interessava-se por animais de sangue-quente, pois, o desenvolvimento de processos fisiológicos e patológicos estaria mais próximo do ser humano. A acessibilidade de diferentes tecidos, que se comportavam bem em culturas, fez com que o embrião de galinha fosse o material de escolha, porém, o desenvolvimento de animais experimentais, em especial os roedores geneticamente puros, levou essa espécie à vanguarda da cultura de tecidos. Enquanto os embriões de galinhas poderiam prover uma diversidade de tipos celulares em culturas primárias, os tecidos de roedores possuíam a vantagem de fornecer linhagens celulares contínuas (EARLE, 1943).

O desenvolvimento da tecnologia transgênica de ratos (PEAT et al., 1992), concomitante a uma experiência genética bem estabelecida, difundiu o uso de roedores geneticamente puros. A demonstração de que tumores humanos poderiam também dar origem a linhagens celulares contínuas, como as linhagens do tipo celular HeLa (GEY; COFFMAN; KUBICEK, 1952), aumentou o interesse em cultura de tecidos humanos. O desenvolvimento da cultura de tecidos humanos ocorreu devido a necessidade de dois ramos extremamente importantes na pesquisa médica: a produção de vacinas antivirais e o entendimento de neoplasias.

O estudo, *in vitro*, com cultura de células é utilizado devido a facilidade de padronização da amostra, pois o pH, a temperatura, a pressão osmótica, a tensão de CO₂ e O₂ podem ser controlados de maneira precisa. A caracterização e homogeneidade da amostra com culturas celulares idênticas, além da economia no custo de reagentes que são utilizados em menor quantidade, são vantagens desse tipo de estudo. As desvantagens são a necessidade de um ambiente de trabalho asséptico e de treinamento do pesquisador (FRESHNEY, 1990).

A tecnologia de cultura de tecidos foi adotada em muitas situações rotineiras, por exemplo: a análise cromossômica de células derivadas do útero pode revelar desordens genéticas na criança que ainda está por nascer, infecções virais podem ser avaliadas quantitativamente e qualitativamente em cultura de células apropriadas do hospedeiro, efeitos tóxicos de fármacos e poluentes ambientais podem ser avaliados, etc. Desse modo, a cultura celular é uma tecnologia indispensável nos ramos das ciências biológicas, pois, fornece as bases para o estudo da proliferação celular, diferenciação e formação de produtos em condições cuidadosamente controladas.

Outras aplicações da cultura de tecidos incluem a cultura de células da epiderme (GREEN; KEHINDE; THOMAS, 1979) e células endoteliais formadoras de capilares (FOLKMAN; HAUDENSCHILD, 1980), além do uso de enxertos autógenos e cirurgias reconstrutivas utilizando as células do próprio paciente (BURT et al., 1989; DENNIS, 1992).

Indica-se, em alguns casos de queimaduras, realizar uma biópsia da derme do paciente, propagar essas células em uma cultura primária e enxertar essas células cultivadas em matrizes tridimensionais nas áreas mais afetadas pelas queimaduras (BOYCE; HANSBROUGH, 1988).

Na área odontológica, um grande número de estudos experimentais sobre efeitos adversos extraídos dos materiais dentários foi publicado nas décadas de 50, 60 e 70. Nesse período, duas principais correntes na literatura podem ser distinguidas, uma conduzia estudos animais, em que os materiais eram aplicados da forma como seriam utilizados em pacientes e as reações teciduais eram observadas através de técnicas histológicas. As técnicas experimentais envolvendo modelos animais, principalmente primatas não-humanos, foram melhoradas pela padronização das técnicas histológicas e procedimentos de avaliação (LANGELAND et al., 1966; BAUME; HOLZ; FIORE DONNO, 1972). A segunda corrente concentrou-se em técnicas de cultura celular. Esses métodos tornaram-se disponíveis para a pesquisa odontológica durante a década de 1950, no Japão, e um dos pioneiros neste campo foi H. Kawahara (KAWAHARA; SHIOTA; YAMAKAWA, 1955). Tang et al. (1999) e Huang et al. (2002) avaliaram a citotoxicidade de cimentos adesivos ortodônticos em culturas, *in vitro*, de fibroblastos humanos obtidos da cavidade bucal.

Nota-se que desde o desenvolvimento dessa modalidade de estudo, essa disciplina destaca-se como um instrumento imprescindível e

integrante em diversas áreas, como a genética molecular, a biotecnologia, a imunologia, a cirurgia, a bioengenharia e a fabricação de produtos farmacêuticos (LEON, 1993; MASTERS, 2000).

2.7 MEIO DE CULTURA

Os experimentos com cultura de tecidos teve início no princípio do século. Nesta época o meio de cultura era extraído de fontes naturais, como linfa e coágulos de plasma. Obviamente, a composição extremamente variável desses meios impedia a realização de dois experimentos nas mesmas condições. Esta limitação, aliada à importância intrínseca de se identificar todos os componentes do meio de cultura necessários à sobrevivência e ao crescimento para cada tipo de célula, despertou o interesse precoce de se estabelecer o meio quimicamente definido. Somente na década de 50 é que se conseguiu formular o primeiro meio quimicamente definido, constituído por sais, vitaminas, aminoácidos, carboidratos e fatores séricos (EAGLE, 1955).

Esse meio era incapaz de garantir por si só o crescimento celular, sendo necessária, a presença de fatores séricos. Nesta época, acreditava-se que o soro era necessário para fornecer algum tipo de nutriente. Posteriormente, descobriu-se que a função do soro no meio de cultura era fornecer fatores de crescimento e não nutrientes. Esses últimos são fornecidos pela parte quimicamente definida do meio de cultura (ARMELIN, 1975). Inicialmente, a busca do estabelecimento de quais os componentes do soro necessários à sobrevivência e crescimento de cada tipo de célula era feita através de tentativas de análise bioquímica dos componentes ativos isolados diretamente do soro. Esse tipo de estudo foi muito difícil e não produziu resultados práticos importantes. A dificuldade foi devido principalmente à complexidade e as baixas concentrações de cada hormônio presente no soro associado ao fato de que muito destes fatores se ligam à carregadores perdendo sua atividade quando dissociados e também ao sinergismo apresentado pelos diferentes fatores.

A substituição de um enfoque analítico por um enfoque sintético permitiu a realização de progresso significativo nesta área. Assim, em 1976, HAYASHI e SATO, mostraram ser possível a manutenção de células em meio de cultura sem soro, por diversas gerações. Neste experimento a presença do soro foi necessário antes e depois da tripsinização da cultura para o repique. Posteriormente, ao se adicionar

ao meio de cultura uma mistura de hormônios e certa quantidade de fibronectina tornou-se possível garantir a sobrevivência de diversos tipos de células em total ausência de soro (ORLY e SATO, 1979).

2.8 ESTUDOS REALIZADOS *IN VITRO* COM FIBROBLASTOS

Os fibroblastos são células encontradas com alta predominância no tecido conjuntivo. Na obtenção de uma cultura celular, a partir de explantes de tecido conjuntivo, por desagregação enzimática ou mecânica, e mantida em meios de cultura suplementados com soro, os fibroblastos proliferam-se rapidamente e tornam-se o tipo celular predominante. Após algumas passagens, geralmente, apenas os fibroblastos são as células proliferativas sobreviventes. Uma das razões é que a maioria dos meios de cultura disponíveis otimiza e favorece as linhagens celulares fibroblásticas (SATO et al., 1994).

Kent et al. (1996) avaliaram os efeitos, *in vitro*, do número de passagens de uma cultura de fibroblastos humanos gengivais sobre a morfologia celular, viabilidade celular e expressão de citocinas. A análise compreendeu células da primeira até a décima passagem. A viabilidade celular permaneceu acima de 90% até a 7ª passagem. Os valores obtidos na 8ª, 9ª e 10ª passagens foram 86%, 93% e 87%, respectivamente. Foi observado um aumento do volume celular (tamanho celular) e um decréscimo na quantidade celular com o aumento da idade da cultura. O estudo demonstrou a expressão de IL-1 β , IL-6 e IL-8 na cultura de fibroblastos humanos gengivais e a ausência de expressão IL-1 α e TNF- α .

Essa mudança de volume (tamanho) celular também foi relatada por Pendergrass; Angello; Norwood (1989), que avaliaram aproximadamente 70 passagens das culturas de fibroblastos; os autores observaram volumes originais celulares de aproximadamente 2000 μm^3 , enquanto 5000 μm^3 foram os volumes de células em senescência. Além disso, verificaram perda da capacidade proliferativa em decorrência da idade da cultura. Isso não foi verificado por Kent et al. (1996), no entanto, esses últimos autores trabalharam somente até a décima passagem.

Almeida-Lopes (1999) desenvolveu uma linhagem de fibroblastos de gengiva humana, propondo dois modelos de estudo *in vitro* um com meio de cultivo e SFB a 5% e o outro com 10% de SFB. Analisou a proliferação celular através da contagem do número de células existentes

antes e depois de receberem irradiação com diodos lasers, operando em diferentes comprimentos de onda. Verificou-se que quando as células receberam irradiação com mesma irradiância e fluência, o comprimento de onda que induziu maior proliferação celular foi aquele situado na região do visível. No caso onde se manteve mesma fluência, mas diferente irradiância, o melhor resultado foi obtido com radiação no infravermelho. Em ambos os casos, os grupos irradiados apresentaram proliferação significativamente maior nos grupos irradiados quando comparados ao controle.

Woollons et al. (1997) avaliaram os danos aos DNA celulares de fibroblastos humanos causados por câmaras de bronzamento (UVA e UVB) e pela exposição solar, pois a indução de mutações ao DNA é um pré-requisito para o desenvolvimento de cânceres de pele.

Utilizando-se enzimas específicas de reparo de DNA (endonuclease T4 e endonuclease III) e o Ensaio do Cometa, avaliou-se a ação de duas diferentes câmaras de bronzamento disponíveis comercialmente. Ficou estabelecido que esses aparelhos produzem diferentes tipos de dano ao DNA, associados à fotocarcinogênese de células humanas, e as evidências epidemiológicas existentes confirmam o risco potencial do uso desses aparelhos de bronzamento artificial.

Sant'Anna et al. (2002) estabeleceram e caracterizaram uma linhagem contínua de células derivadas de ligamento periodontal (LP) humano. Essas células foram obtidas através da técnica do explante de tecido removido por raspagem do terço médio das raízes de terceiros molares extraídos de 3 (três) pacientes saudáveis. Posteriormente, as células foram caracterizadas através de microscopia óptica, padrão de crescimento, testes imunohistoquímicos, histoquímicos e enzimáticos. Morfologicamente, apresentaram aspecto fusiforme ou estrelado, compatível com células fibroblásticas. Houve marcação positiva para vimentina, osteonectina, fibronectina, sialoproteína óssea II e tenascina e negativa para anticorpos anti-citoqueratina (AE1/AE3), actina de músculo liso e colágeno III. A presença de nódulos mineralizados sintetizados, *in vitro*, pelas células foi confirmada pelo teste de Von Kossa. Esses resultados, em conjunto, indicaram que as células cultivadas, denominadas FL2, eram derivadas de LP e, portanto, poderiam ser utilizadas em estudos, *in vitro*.

Rossa Júnior; Martinez; Silvério (2002) avaliaram, *in vitro*, o efeito da nicotina sobre a viabilidade e a morfologia celular utilizando-se uma linhagem contínua de fibroblastos. Para tal, foram formados dois

grupos experimentais segundo a dose (0 - controle, 10µg, 100µg, 0,5mg, 1mg de nicotina) e o tempo de condicionamento (1h e 24h). Cada um dos 12 orifícios de uma placa para cultura celular recebeu 2ml de meio de Eagle e 1ml de suspensão de meio de cultura contendo aproximadamente 1×10^5 células/ml. Foi, então, acrescentada a solução de nicotina nas diferentes concentrações. Após o acondicionamento com o fármaco, nos dois períodos testados, as células foram coradas com Azul de Trypan a 0,4% e observadas em microscópio de observação direta. Quanto à morfologia, os resultados obtidos demonstraram, no grupo acondicionado por 1h, que os controles apresentaram diferenças estatisticamente significantes apenas em relação à maior dose de nicotina; no entanto, foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre o controle e todas as concentrações, após 24h de condicionamento. Quanto a viabilidade celular, um maior número de células não viáveis foi observado nas diferentes concentrações de nicotina em comparação aos controles, tanto após 1h quanto 24h de condicionamento ($p < 0,05$). Em ambos os períodos, houve uma tendência significativa de aumento do número de células não viáveis com o aumento da dose de nicotina ($p = 0,0053$; $p = 0,00001$ após 1h e 24h, respectivamente). Portanto, concluiu-se que a nicotina pode alterar *in vitro* a viabilidade e a morfologia de fibroblastos de forma proporcional à dose e ao tempo de exposição.

Andrighetti-Frohner (2003) avaliou a citotoxicidade e a genotoxicidade da violaceína, metabólito da bactéria *Chromobacterium violaceum*, sobre culturas de células VERO (fibroblastos de rins do macaco verde da África), células FRhK-4 (células fetais de rins de macacos *rhesus*), células Hep-2 (células de carcinoma de orofaringe humana) e células MA104 (fibroblastos obtidos a partir de rins embrionários do macaco *rhesus*). A viabilidade celular de seus controles negativos (onde a violaceína não foi empregada) permaneceu acima de 90% para todas as linhagens celulares. Os danos aos DNA celulares, determinados através do Ensaio do Cometa, encontrados com o uso do peróxido de hidrogênio a 200µm, foram de $153,33 \pm 12,81$, $145,17 \pm 3,03$, $142,83 \pm 5,06$ e $131,33 \pm 4,63$ para as células VERO, FRhK-4, MA104 e Hep-2, respectivamente. Os danos encontrados em seus controles negativos foram de $12,67 \pm 1,30$, $20,50 \pm 0,58$, $33,33 \pm 3,76$ e $\pm 23,67 \pm 6,84$ para as mesmas linhagens celulares. O estudo verificou que a violaceína teve efeito citotóxico e genotóxico, concentração-dependente, nas diferentes linhagens celulares.

2.9 PLASMA RICO EM PLAQUETAS (PRP)

Na década de 60, acreditava-se que o crescimento de fibroblastos 3T3 era diretamente controlado por fatores séricos. Nesta época a endocrinologia considerava os fibroblastos como células que não serviam de alvo para os hormônios clássicos porque foram falhas as tentativas de detectar a ação hormonal no controle da proliferação de mamíferos (HOLLEY e KIERNAN, 1968). Alguns anos mais tarde é que foi proposto que os fatores séricos que controlavam o crescimento das células 3T3 seriam na realidade o fator de crescimento, de natureza endócrina (ARMELIN, 1973).

O primeiro fator de crescimento descoberto foi o NGF (fator de crescimento neural), descoberto em 1954, porém apenas posteriormente isolado e caracterizado (GREENE e SHOOTER, 1980). Em 1962, COHEN, trabalhando no isolamento de NGF, descobriu e isolou o EGF (fator de crescimento epidermal). Através dos estudos da endocrinologia clássica foram descobertos ainda as somatomedinas e o fator de crescimento de insulina. Um novo impulso foi dado ao estudo dos fatores de crescimento quando descobriu-se que as células 3T3 podiam ser estimuladas por um fator de crescimento de fibroblastos presente em extratos de hipófise bovina (ARMELIN, 1973). Este trabalho, além de mostrar que os fibroblastos poderiam servir de células alvo para fatores hormonais, forneceu ainda um bom protocolo para testes de atividade dos fatores de crescimento. Posteriormente foi descoberto, a partir das plaquetas sanguíneas humanas, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), um fator peptídico para fibroblastos (ROSS et al, 1978).

Todos os procedimentos de cultura primária de fibroblastos realizados nesta pesquisa serão baseados na dissertação “Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos da gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA” (COURA, 2004).

2.9.1 Fatores de crescimento

Os fatores de crescimento são mediadores biológicos naturais que exercem vários efeitos sobre os processos de reparo e de regeneração. Estes polipeptídios são a chave para regular diversos eventos celulares

tais como: síntese de DNA, quimiotaxia, citodiferenciação e síntese de matriz (ANITUA, 1999; LYNCH, 1999; GIANNOBILE, 1999). Podemos encontrar fatores de crescimento, no osso, no cimento e em vários tecidos de cicatrização. Como exemplo podemos citar: PDGF, TGF- β s, IGF-I e II, e BMPs (RIPAMONTI e REDDI, 1994). Estas moléculas naturais são iniciadores universais de quase todos os processos cicatriciais (MARX et al., 1998). Estudos específicos do PRP identificaram uma lista completa de fatores de crescimento, destes, pelo menos três importantes fatores de crescimento são derivados dos grânulos α -plaquetários, a saber: fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento de transformação beta (TGF- β s,) e o fator de crescimento similar a insulina (IGFs), (LYNCH e BUSER, 1991; MARX et al., 1998).

2.9.2 Processo de obtenção

O PRP é obtido a partir de sangue autógeno por meio de um processo que utiliza o princípio da separação celular por centrifugação diferencial, no qual se retira sangue do doador e separam-se as substâncias desejadas (RAVEL, 1997).

A sequência do processo é basicamente a seguinte: punção venosa, retirada do sangue e separação celular. A punção venosa e a retirada de sangue podem ser realizadas através de 3 técnicas descritas na literatura. A primeira, que será abordado neste trabalho, é a obtenção de uma bolsa de sangue total, que corresponde a retirada em média de 440 a 460 ml (MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997); a segunda remove o tecido sanguíneo armazenando-o em túbulos de 10 ml (ANITUA, 1999); e a terceira corresponde a técnica de aférese onde um separador celular de densidade gradiente é utilizado obtendo-se somente as células escolhidas sem coletar o sangue (LYNCH, 1999). A separação dos elementos do sangue retirado é feita por meio da centrifugação, partindo do mais denso para o menos denso, sendo estabelecido diferentes protocolos devido as diferenças do volume coletado. Todas as técnicas buscam como produto final o PRP (ANITUA, 1999; MARX, 1999; WHITMAN et al., 1997).

2.9.3 Técnica de aplicação clínica

Após a obtenção do PRP, o mesmo é armazenado em recipiente específico, ou seja bolsa, mantida em temperatura ambiente a 22°C, em agitação constante, para que ocorra troca gasosa com o meio, evitando desta forma acidificação do pH. Na aplicação clínica do PRP associados com enxertos ósseos particulados é necessário a ativação do processo de coagulação. Esta ativação pode ser realizada usando o cloreto de cálcio a 10% na proporção de 1:7 com PRP (MARX, 1999). Outros autores preconizam esta ativação incorporando além do cloreto de cálcio 10% a trombina bovina tópica (10.000 unidades) (WHITMAN et al., 1997). O processo de coagulação ativado estabelece a geleificação da mistura. O gel de plaquetas associado com enxerto ósseo previamente obtido por este processamento é introduzido no leito cirúrgico. Misturas adicionais são inseridas em camadas subseqüentes (WHITMAN et al., 1997; MARX, 1999).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma técnica cirúrgica de enxertia gengival com um mínimo de morbidade com previsibilidade e com uma possibilidade de realização de enxertos maiores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Testar diferentes materiais que podem ser arcabouços para células do tecido gengival.
- Avaliar clinicamente e histologicamente a previsibilidade da enxertia desses arcabouços colonizados por células gengivais in vivo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 44 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos jovens (20-24 semanas), machos, pesando em média 180g. Esses ratos tiveram de apresentar um estado de saúde geral considerado bom e foram submetidos aos tratamentos profiláticos necessários como vacinação e dieta conforme as recomendações veterinárias determinadas pelo Biotério da UFSC e pelo veterinário responsável pelos tratamentos pré, trans e pós-cirúrgicos. Os animais foram armazenados e cuidados no LANDI.

4.2 PROFILAXIA ANTIBIÓTICA

Antes dos procedimentos cirúrgicos foi administrado intramuscularmente uma dose de antibiótico de 40000 U por quilo de peso do animal animal (Pentabiótico® - Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Campinas, SP).

4.3 PROCEDIMENTOS PRÉ-OPERATÓRIOS

Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com uma combinação de 90 mg/kg de cloridrato de cetamina 10% (Cetamin, Syntec, Cotia – São Paulo) e 10 mg/kg cloridrato de xilazina 2% (Xilazin, Syntec, Cotia – São Paulo). A região escolhida para o estudo foi mucosa oral jugal dos animais.

4.4 COLETA DO TECIDO AUTÓGENO

O animal foi posicionado sobre a mesa cirúrgica em decúbito ventral e com a cabeça imobilizada em três pontos fixos com o auxílio de uma mesa para estereotaxia. Após a realização da desinfecção com clorexidina 0,12%, foi realizado sob anestesia geral a biópsia (explante) de aproximadamente 5mm² (2,5 x 2,2mm) de mucosa queratinizada (epitélio e tecido conjuntivo) da região palatal, através de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica nº 15C.

4.5 OBTENÇÃO DO PRP

Para metodizar a obtenção do PRP, foi utilizado o protocolo estabelecido pelo Núcleo de Hemoterapia da Faculdade de Farmácia Bioquímica - Unesp – Campus de Araraquara.

Todos os procedimentos de cultura primária de fibroblastos realizados nesta pesquisa serão baseados na dissertação “Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos da gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA” (COURA, 2004).

No meio de cultura dos fibroblastos não será utilizado o Soro Fetal Bovino (SFB) preconizado no trabalho de Coura. Em contrapartida, será utilizado Plasma Rico em Plaquetas (PRP) que apresentou bons resultados no crescimento e manutenção estável da linhagem de células testadas na dissertação “Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – Estudo *in vitro*” (FILHO, 2002).

A coleta de sangue total foi efetuada empregando-se a técnica de venipuntura com o mínimo de traumatismo para não desencadear os fatores plaquetários; facilitando adesividade, aglutinação e a aglomeração plaquetária. Uma unidade de sangue foi acondicionada a uma tripla bolsa coletora padronizada e devidamente identificada contendo anti-coagulante CPDA-1, obtendo-se um volume total de 200 ml, devendo ser processadas em um período de até 6 horas após a coleta.

A tripla bolsa de sangue foi posicionada na centrífuga, para promover a separação dos componentes sanguíneos por ordem de densidade, a uma velocidade de 2.200 rpm por 5 minutos a 22°C.

Após a primeira centrifugação retirou-se as bolsas do interior da máquina e removeu-se o sobrenadante diretamente para a segunda bolsa coletora, sendo separada a bolsa contendo eritrócitos das outras duas. Esta bolsa contendo eritrócitos foi enviada ao banco de sangue. A bolsa tripla passa a ser dupla, onde uma das partes apresenta o plasma pobre em plaquetas e a última bolsa que até o presente momento não apresenta nada.

As bolsas retornam para a centrífuga, onde foram submetida a nova centrifugação, na velocidade de 4,100 rpm, por 10 minutos a 22 °C. Retira-se a bolsa do interior da máquina e extraiu-se o sobrenadante diretamente para a última bolsa coletora. Separou-se a bolsa e obtém-se o PRP e o plasma pobre em plaquetas.

A bolsa contendo PRP foi pesada para certificar se a relação peso volume está proporcional entre 60 gr para 70 ml. Esta bolsa foi colocada em um agitador para homogeneização das plaquetas, ficando por 1 hora em temperatura de 20 a 22°C onde ocorreu a desagregação espontânea das plaquetas, para finalização do PRP.

Para uma centrifugação ser considerada eficiente é necessário que o Plasma Rico em Plaquetas contenha pelo menos 70% das plaquetas do Sangue Total. A estocagem deve ser feita a 22°C, em agitação constante, para que ocorram trocas gasosas com o meio, evitando desta forma acidificação do pH. Esta troca é possível pela constituição da bolsa que é de cloreto de polivinila e di-2-etil-hexil-ftalato.

Foram coletados 8 ml do PRP em seringa de 20ml, sendo colocado 1 ml em tubo de microcentrífuga* devidamente identificado, recebendo a sigla I, onde doravante denominaremos de PRP puro. Seguindo o tramite clínico normal, na seringa o qual restava os 7 ml de PRP foi incorporado 1 ml de CICA a 10% passando a ter uma proporção de 7 para 1. Após o tempo de 1 minuto para que ocorresse a reação de quebra plaquetária foram coletados outros 1 ml desta mistura e colocados em tubo de microcentrífuga devidamente identificado, recebendo a sigla II, onde doravante denominaremos de PRP ativado.

4.6 CULTURA PRIMÁRIA

Todos os procedimentos para a obtenção do cultivo primário de fibroblastos gengivais humanos foram realizados sob capela de fluxo laminar (VECO, Campinas, Brasil), em temperatura ambiente, entre 25 e 28°C, em um laboratório de segurança do tipo P2, preparado para a manipulação de microorganismos pertencentes ao grupo de risco 2 (risco individual moderado e risco coletivo limitado; microorganismos que podem provocar doenças no homem, com pouca probabilidade de alto risco para os profissionais do laboratório), assegurando maior proteção aos pesquisadores. Todas as substâncias líquidas foram quantificadas com o auxílio de micropipetas automáticas.

A amostra de 5mm² foi lavada por 2 vezes com solução salina de fosfato tamponada (PBS) e, posteriormente, o tecido epitelial foi removido com o auxílio de cabo de bisturi nº 3 e lâmina cirúrgica nº 15, em placas de Petri de 60mm de diâmetro, que contém 5ml do meio de cultura. A escolha do cultivo de fibroblastos gengivais eliminando os ceratinócitos reside no fato demonstrado por Lõe et al. (1971 e 1974) de

que a ceratinização do epitélio bucal é controlada por estímulos morfogenéticos do tecido conjuntivo subepitelial.

Após a desepitelização, a amostra foi fragmentada em 5 partes (explantes) de aproximadamente 1mm^2 . Em cada uma das 5 (cinco) garrafas de cultura de 25cm^2 , previamente pré-incubadas a 37°C , 5% de CO_2 com 2ml do meio de cultura devidamente suplementado, por 20min., para equilíbrio da fase gasosa, 1 (hum) explante foi adicionado concomitante a colocação de mais 2ml de meio de cultura. As garrafas de cultura permaneceram invertidas por 2h na estufa a 37°C , 5% de CO_2 (NUAIRE US AUTOFLOW CO_2 Water Jacketed Incubator, EUA) para aderência dos explantes ao substrato. Após, as garrafas de cultura foram colocadas na sua posição original e o crescimento celular foi checado, diariamente, através de um microscópio de fase invertida (40x a 200x, Olympus, Japão).

Quando uma subconfluência de aproximadamente 70% foi atingida, as células foram tripsinizadas (para obter individualização celular) e essa cultura primária deu origem a uma nova subcultura na proporção de 1:1. Na primeira passagem, os explantes foram removidos. A subcultura, ou passagem de células de uma garrafa para outra, geralmente implica na subdivisão de uma população celular proliferativa capaz de perpetuação através de estabelecimento de uma linhagem celular. O número de passagem significa o número de vezes que uma cultura foi subcultivada.

O meio de cultura foi trocado a cada 4 (quatro) dias substituindo-se apenas metade do conteúdo das garrafas de cultura, ou seja, 2ml de meio de cultura novo. A alteração da coloração do meio de cultura, que indica atividade metabólica celular e alteração de pH, foi controlada diariamente.

Para perpetuação dessa linhagem celular, o meio de cultura foi removido e essas células foram lavadas por 2 (duas) vezes com PBS ($0,2\text{ml}/\text{cm}^2$) e retiradas de seu substrato pela ação da tripsina ($500\mu\text{l}$), durante 5min a 37°C (tripsinização). A inativação da tripsina foi realizada pela adição de 4ml de meio de cultura (DMEM/PSA). Posteriormente, as 5 (cinco) garrafas retornaram para a estufa de CO_2 onde permaneceram incubadas e monitoradas diariamente até que nova subconfluência fosse atingida. Na 6a passagem, as amostras celulares foram removidas das 5 (cinco) garrafas de cultura.

4.7 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS DE ENXERTO

Os animais foram submetidos a todos os cuidados de desinfecção e assepsia. Foi confeccionado um defeito circular com o diâmetro de 10mm na mucosa jugal bilateral dos animais, padronizado por meio de uma broca trefina, onde os grupos foram organizados aleatoriamente. Os ratos foram divididos em 06 grupos: Grupo 1 (n=14) onde foi realizado apenas defeito na area operada, sem recobrimento (controle negativo, ou CN). Grupo 2 (n=9), grupo controle onde o defeito foi recoberto com enxerto gengival livre de area doadora do palato (EGL). Grupo 3 (n=13), defeito foi recoberto apenas com celulose bacteriana (BC) na região operada. Grupo 4 (n=6), o defeito foi recoberto com a colocação de matriz dérmica acelular (SureDerm) na região operada (MDA). Grupo 5 (n=10), defeito foi recoberto com celulose bacteriana associada à cultura primária de fibroblastos (BC+CC). Grupo 6 (n=6), defeito com recoberto com matriz dérmica acelular associada à cultura primária de fibroblastos (MDA+CC).



Figura 1 - Defeito criado em mucosa jugal esquerda em um dos animais devidamente anestesiados.

NOTAS: Todos os defeitos criados seguirão um padrão de tamanho específico. Nos animais do grupo 1 (controle negativo), os defeitos foram apenas criados, sem nenhum recobrimento, como a imagem ilustra.

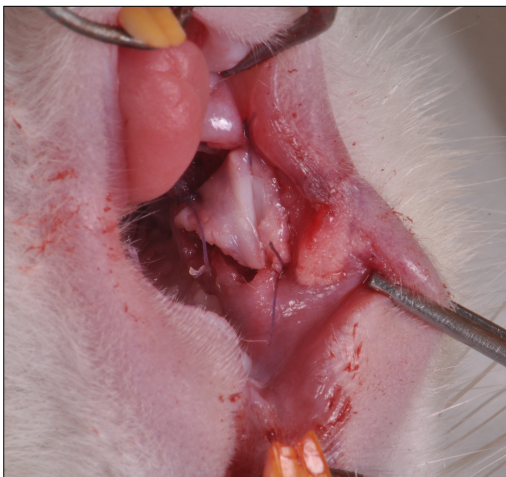


Figura 2 - Após criado o defeito, o recobrimento era realizado de acordo com o respectivo grupo. Ilustração do enxerto gengival livre proveniente do palato duro (grupo 2).

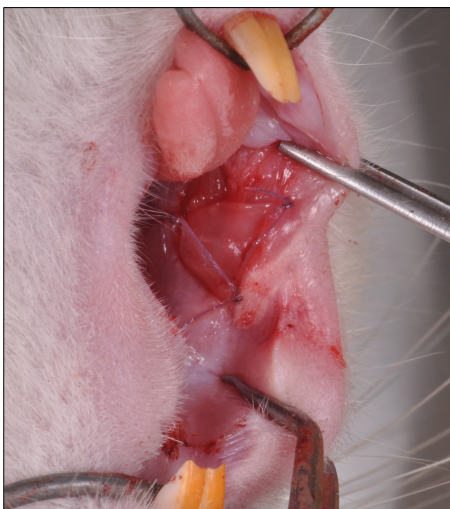


Figura 3 - Após criado o defeito, o recobrimento era realizado de acordo com o respectivo grupo. Ilustração do enxerto de celulose bacteriana (grupo 3).

4.8 CUIDADOS PÓS-OPERATÓRIOS

Logo após as cirurgias os animais foram acompanhados até cessar o efeito do anestésico. Os animais foram acompanhados durante 15 dias após as cirurgias, onde foi realizada avaliação quanto à integridade das suturas, o aspecto clínico da área operada e os aspectos de saúde geral dos animais.

4.9 AVALIAÇÃO CLÍNICA E OBTENÇÃO DAS PEÇAS

15 dias após a cirurgia de enxertia, foi realizada uma avaliação clínica da área operada, considerando as alterações encontradas no tecido, tais como, presença clínica de queratina; presença clínica de tecido granulomatoso; presença de ulceração; continuidade do epitélio; regularidade do epitélio; presença clínica de rubor; presença clínica de edema; presença visível do arcabouço. Os animais foram submetidos ao protocolo de anestesia supracitado e, após, a verificação do plano anestésico ideal, foi realizada uma biópsia da região enxertada.

4.10 PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

As amostras teciduais foram fixadas em formaldeído 10% durante 72 horas, desidratados numa série ascendente de concentração de álcool (70% a 100%) e embebidos em Paraplast (Leica). As amostras foram cortados em 5 microns, em seções semiserial e corados com hematoxilina-eosina (H & E).

A análise histológica com coloração de H & E consistiu na comparação qualitativa das amostras de tecidos a partir dos grupos contendo os biomateriais com cultura primária de fibroblastos, apenas contendo biomateriais e os grupos controle com respeito a alterações dos tecidos, tais como a presença de infiltrado inflamatório.

4.11 ANÁLISE HISTOMORFOMÉTRICA

Todas as lâminas histológicas foram fotografadas e analisadas as cegas por um pesquisador experiente. Foram anotadas as alterações encontradas nos tecidos, tais como, presença de crista epitelial; interrupção na continuidade do epitélio; espessura do epitélio; camada de queratina; presença de infiltrado inflamatório no conjuntivo;

características do conjuntivo, rico em fibras ou rico em células; presença de vasos sanguíneos, dilatados ou normais; áreas de hemorragias.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE CLÍNICA

Após a análise descritiva de cada uma das amostras realizadas através de fotografias clínicas em boca e após exérese do fragmento, os resultados serão exposto de acordo com os grupos experimentais.

5.1.1 Grupo controle sem recobrimento (CN)

Em geral, neste grupo onde foi realizado apenas o defeito no local (controle negativo), foi observado uma presença leve ou ausente de tecido queratinizado na região operada, onde ao perceber a resposta inflamatória de cicatrização por segunda intenção, percebemos uma presença sutil deste item na maioria das amostras correspondentes. Com relação a presença de tecido granulomatoso na lesão, foi analisado que, na maioria das amostras, era observado ausência deste item, com a minoria apontando presença de tecido granulomatoso. Sobre o fato de presenciarmos ulcera nas lesões, na maioria das amostras foi observado ausência de ulceração, mostrando uma rápida proliferação celular a ponto de analisarmos presença de ulcera na minoria dos casos. Com relação ao item de descontinuidade da mucosa oral, na maioria dos casos foi observado que não houve perda de continuidade do tecido, seguindo a lógica da maioria não apresentar úlceras. Em relação ao item que corresponde à regularidade do tecido, foi observado que a grande maioria das amostras deste grupo mostram o tecido com aspecto e consistência de tecido fibroso, com mucosa apresentando irregularidade acentuada, com superfície rugosa, com boa parte das amostras apresentando coloração semelhante a mucosa queratinizada em pontos da lesão, com consistência fibrosa. Sobre o fato que apresentar sinais inflamatórios de rubor, foi visto que na maioria das amostras não foi observado este sinal inflamatório. Com relação a presença de edema, foi observado que em uma considerável parte do grupo apresentava a região levemente edemaciada, talvez pelo aspecto fibroso que as amostras se apresentavam em tecido conjuntivo. E em quanto ao item de percepção a presença de arcabouço na lesão, em nenhuma das amostras obtivemos suspeitas de arcabouço envolvido nestas lesões.



Figura 4 - Imagem clínica do grupo controle sem recobrimento após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

5.1.2 Grupo controle com enxerto gengival livre (EGL)

Em geral, neste grupo onde realizamos recobrimento do defeito com enxerto gengival livre proveniente do palato dos animais, foi observado uma presença leve a moderada de tecido queratinizado, evidenciando que o tecido retirado da região de palato duro anterior proporcionou maior volume de tecido com queratina. Quanto ao item de presença ou ausência de tecido de granulação, neste grupo foi observado que mais de metade das amostras havia tecido de granulação, mostrando talvez uma maior resposta inflamatória pela presença do tecido autógeno envolvido na lesão. Com relação a presença e ausência de úlceras nas lesões, foi observado neste grupo que a maioria das amostras possuem úlceras em suas lesões, evidenciando dificuldade de proliferação epitelial nas mesmas. Sofre o fato de se houve perda de continuidade da mucosa oral, foi observado que a maioria das amostras deste grupo apresentavam perda de continuidade de alguma maneira, onde foi observado evidências clínicas que o epitélio estava se proliferando para a região adjacente na lesão. Com relação ao item que corresponde a regularidade do tecido, foi observado que as amostras deste grupo apresentaram em geral regiões com aspecto superficial liso, com regiões que apresentavam superfície rugosa e consistência mais fibrosa, com

áreas de elevação em relação as outras regiões da mucosa. Em quanto ao item de presença de sinal de rubor da inflamação, metade do grupo apresentou rubor, em regiões onde se localizam as úlceras. Sobre o item presença de edema na lesão, foi observado que a maioria das amostras apresentavam leve presença de edema nas lesões. E quanto ao item de percepção de presença de arcabouço na lesão, não tivemos nenhuma suspeita de envolvimento de arcabouço em nenhuma amostra deste grupo.



Figura 5 - Imagem clínica do grupo controle com enxerto gengival livre após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

5.1.3 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana (CB)

Em geral, neste grupo onde foi realizado recobrimento do defeito com matriz de celulose bacteriana, foi observado uma presença leve a moderada de tecido queratinizado, tendo uma resposta a colocação do biomaterial. Em relação ao item de presença ou ausência de tecido de granulação, foi observado que parte das amostras apresentaram presença de tecido de granulação, porém a maioria mostrava ausência deste. Com relação à presença de úlceras nas lesões, observamos que na maioria das amostras havia presença de ulceração, ocorrendo suspeita também de recobrimento do biomaterial nessas regiões de descontinuidade epitelial. Sobre o item de integridade do tecido, foi observado que na maioria das amostras do grupo apresentou perda de continuidade do epitélio, sendo com algum surgimento de úlcera ou contato com possível arcabouço. Ao

analisarmos o item de regularidade do tecido, observamos que as superfícies das amostras variavam entre ser predominantemente liso a levemente rugoso ou fibroso, porém existiu uma predominância à lesão se comportar com aspecto liso, com pontos onde a superfície da mucosa era irregular com coloração semelhante a mucosa queratinizada, geralmente próxima à região de úlcera. Sobre o item de presença ou ausência de sinal inflamatório de rubor, foi observado que uma boa parte apresentou este sinal próximo a região de úlcera, porém a maioria demonstrava ausência deste sinal. Com relação a presença de edema na região, observamos que boa parte apresentou leve edema, porém a maioria do grupo demonstrou ausência deste sinal. E quanto ao item de percepção a presença de arcabouço na lesão, obtivemos suspeita de presença de arcabouço em metade do grupo envolvido nestas lesões.



Figura 6 - Imagem clínica do grupo com recobrimento com celulose bacteriana após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

5.1.4 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (SureDerm®) (MDA)

Em geral, neste grupo onde foi realizado recobrimento dos defeitos com matrix dérmica acelular, foi observado uma presença moderada de tecido queratinizado, onde notamos que a presença da matriz dérmica acelular influenciou de maneira que obtivesse maior volume de queratinização da região envolvida. Em relação a presença ou a ausência de tecido granulomatoso na lesão, foi notado que na grande maioria das amostras havia ausência de tecido de granulação, onde em

apenas uma amostra foi notada a mesma. Com relação a presença de úlcera na lesão, foi notado que na maioria das amostras era ausente a presença de úlceras na lesão. Sobre o item de descontinuidade da mucosa oral, podemos observar que grande parte das amostras não apresentaram perda de continuidade, com a minoria apresentando algum tipo de descontinuidade epitelial, seguindo a lógica da quantidade de úlceras. Em quanto ao item de regularidade do tecido, observamos que a grande maioria das amostras apresentou aspecto de tecido queratinizado, com consistência fibrosa, superfície levemente rugosa e levemente irregular, apresentando coloração semelhante a mucosa queratinizada. Com relação ao item de presença de sinal inflamatório de rubor, foi notado que em nenhuma amostra foi analisada presença de rubor. Em quanto a presença de edema em lesão, observamos que a maioria apresentou algum aumento de volume, onde pode ter sido apresentado edema por inflamação, ou aumento de volume como resultado de formação de tecido fibroso em tecido conjuntivo, devido processo cicatricial. E em quanto ao item de percepção a presença de arcabouço na lesão, em apenas um caso obtivemos suspeita de arcabouço de matriz dérmica acelular envolvido nestas lesões.



Figura 7 - Imagem clínica do grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

5.1.5 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos (CB+CC)

Neste grupo onde recobrimos o defeito com uma matriz de celulose bacteriana associada a uma cultura primária de fibroblastos enriquecida com PRP, em geral, foi observado uma presença moderada de tecido queratinizado, onde percebemos que a presença do arcabouço de celulose bacteriana associada a cultura primária causou uma formação considerável de queratina. Em relação à presença de tecido de granulação, foi analisado que praticamente metade do grupo apresentou presença de tecido de granulação nas lesões. Quanto ao fato de observarmos úlceras nas lesões, a maioria das amostras deste grupo apresentou úlcera em região de lesão, apresentando lenta proliferação epitelial, a ponto de observarmos proliferação completa na minoria dos casos. Com relação ao item de descontinuidade da mucosa oral, na maioria das amostras foi observado perda de continuidade tecidual, seguindo a lógica de a maioria apresentar úlceras nas lesões. Em quanto ao item que corresponde à regularidade do tecido, observamos que um pouco mais da metade do grupo apresentou tecido com aspecto liso, variando em regularidade de superfície, com a maioria apresentando leve irregularidade superficial, com áreas de queratina mais elevadas com relação ao restante da mucosa da lesão. Nas amostras que se apresentavam com aspecto fibroso, foi observado coloração semelhante a mucosa queratinizada, e, em áreas próximas à úlcera, foi observado bordas elevadas e algumas amostras ainda com presença de fio de sutura. Com relação à presença do sinal clínico inflamatório de rubor, foi analisado que na maioria dos casos deste grupo, foi presenciado sinal clínico de rubor, com algumas amostras mostrando mais intensidade no sinal, outras com aspecto mais amenos. Ao analisar o item de presença de edema, foi analisado que a maioria dos casos apresentou algum grau de edema nas regiões onde se localizavam as lesões, podendo ser ocasionado pelo processo inflamatório propriamente dito ou, em suspeita, da presença de fibrose em tecido conjuntivo, por processo cicatricial. E em quanto ao item de percepção a presença de arcabouço na lesão, na minoria dos casos obtivemos suspeitas de arcabouço de celulose bacteriana envolvido nestas lesões.

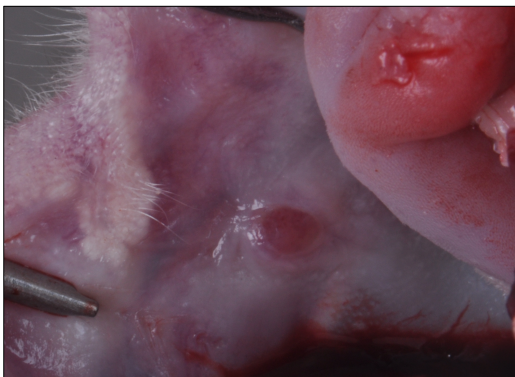


Figura 8 - Imagem clínica do grupo controle com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

5.1.6 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (SureDerm®) associada à cultura primária de fibroblastos (MDA+CC)

Em geral, neste grupo onde realizamos recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular associada a uma cultura primária de fibroblastos enriquecida com PRP, foi observado uma leve presença de tecido queratinizado na região, onde observamos bom aspecto clínico do reparo. Com relação a presença ou ausência de tecido de granulação na lesão, foi observado ausência de tecido de granulação em todas as amostras deste grupo. Ao analisarmos o item de presença ou não de úlceras nas lesões, foi analisado que em nenhuma amostra deste grupo foi observado úlceras, mostrando que a proliferação celular epitelial foi eficiente ao ponto de não haver tecido conjuntivo exposto. Com relação ao item de descontinuidade da mucosa oral, observamos que não houve perda de continuidade em nenhum dos casos, seguindo a lógica da ausência de úlceras, e ausência de arcabouço visível adjacente ao epitélio. Com relação ao item correspondente à regularidade tecidual, foi observado que o tecido apresentou bom processo de cicatrização, onde observamos uma mucosa com aspecto liso, regular em superfície, consistência frouxa, coloração em geral semelhante a mucosa, com algumas amostras com regiões queratinizadas. Sobre o fato de apresentação do sinal inflamatório de rubor, foi observado que não há

presença de rubor em nenhuma das amostras deste grupo. Com relação ao edema em região da lesão, não foi observado em nenhuma das amostras sinais clínicos de edema. E em quanto ao item de percepção a presença de arcabouço na lesão, em nenhuma das amostras foi obtida suspeita de percepção de arcabouço envolvido nestas lesões.



Figura 9 - Imagem clínica do grupo controle com recobrimento com matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos após 15 dias de cicatrização que melhor ilustrou as características descritas pelos analisadores que este grupo apresentou.

Tabela 1 - Características clínicas mais comuns das amostras dos grupos respectivos.

Grupos	Presença de queratina	Tecido de Granulação	Presença de úlcera	Continuidade Epitelial	Regularidade do Epitélio	Rubor	Edema	Presença de arcabouço
G1	Leve ou ausente	Maioria Ausente	Maioria Ausente	Continuidade	Aspecto fibroso	Maioria Ausente	Leve	Ausente
G2	Leve a moderada	Granulação presente	Úlcera presente	Perda de continuidade	Rugoso com regiões lisas	Metade com rubor	Leve	Ausente
G3	Leve a moderada	Maioria Ausente	Úlcera presente	Perda de continuidade	Liso com regiões fibrosas	Maioria Ausente	Ausente a leve	Metade dos casos
G4	Moderada	Ausente	Ausente	Continuidade	Irregular, rugoso, fibroso	Ausente	Aumento de volume	Uma suspeita
G5	Moderada	Metade com granulação	Úlcera presente	Perda de continuidade	Liso, irregular	Presença de rubor	Aumento de volume	Minoria dos casos
G6	Moderada	Ausente	Ausente	Continuidade	Liso, regular, frouxo	Ausente	Ausente	Ausente

5.2 ANÁLISE HISTOLÓGICA

Após a análise descritiva de cada uma das lâminas histológicas, os resultados serão expostos de acordo com os grupos experimentais.

5.2.1 Grupo controle sem recobrimento (CN)

As amostras do grupo no qual foi mantido o defeito sem recobrimento, de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Com relação ao fato das lâminas apresentarem ou não rista epitelial, observamos que a maioria do grupo apresentou ausência de crista epitelial ou presença muito leve da mesma. Correspondendo ao quesito de continuidade do epitélio da amostra, foi analisado que a grande maioria das amostras apresentavam continuidade do epitélio, sendo apresentado descontinuidade epitelial em apenas dois casos (um mais evidente). Analisando a espessura do epitélio deste grupo, percebemos que a maioria das lâminas apresentavam espessura fina, com amostras apresentando zonas mais moderadas. Sobre o quesito de presença e espessura de camada de queratina, percebemos que a grande maioria das amostras apresentaram ausência ou fina camada, com amostras exibindo aumentos gradativos para espessura moderada. Com relação a presença de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo, foi observado que a maioria das lâminas apresentaram uma presença leve do infiltrado em tecido conjuntivo, porém é importante salientar que uma parcela considerável apresentou presença acentuada de infiltrado. A maioria das amostras apresentaram predominantemente tecido conjuntivo rico em fibras colágenas, salientando que boa parte apresentou tecido conjuntivo com quantidade considerável de células, com presença moderada de fibras. Ao observar a presença de vasos dilatados nas lâminas, notamos que a maioria das amostras apresentou presença regular dos mesmos, todavia, os casos que presenciemos presença leve e intensa, foi praticamente equivalente entre si. Neste grupo, não foi apresentado nenhum caso de hemorragia.

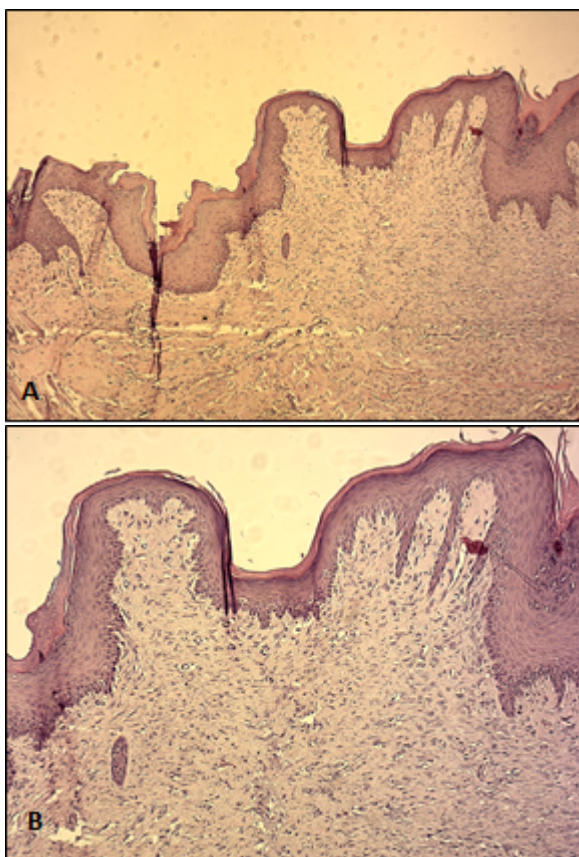


Figura 10 - Lâmina histológica do grupo no qual foi mantido defeito sem recobrimento.

NOTAS: A) É possível observar ausência ou leve presença de crista epitelial, continuidade do epitélio, espessura epitelial fina e ausência de queratina (5X). B) Nesta região podemos observar leve presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença regular de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

5.2.2 Grupo controle com enxerto gengival livre (EGL)

As amostras do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com enxerto gengival livre proveniente do palato, de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Com relação ao fato das lâminas apresentarem ou não crista epitelial, observamos que a grande maioria do grupo apresentou ausência de crista epitelial, onde poucas demonstraram resultados diferentes. Em relação ao quesito de continuidade do epitélio da amostra, foi observado que a maioria apresentou continuidade do tecido epitelial. Tendo como critério a espessura do tecido epitelial, analisamos que a maioria das amostras apresentavam espessura fina, porém a minoria que foi diferente, variaram entre ausência de tecido epitelial, espessura moderada e regular. Sobre a característica de apresentar camada de queratina e sua determinada espessura, foi visto que a maioria das amostras apresentaram ausência de queratina, sendo que a parcela de minoria, apresentou camada de queratina fina. Com relação à apresentação de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo, foi observado que a maioria apresentou presença leve de infiltrado, porém uma parcela da minoria do grupo exibiu presença acentuada da mesma. Perante as características do tecido conjuntivos, percebemos que neste grupo a maioria apresentava predominância de presença de fibras colágenas, tecido conjuntivo fibroso, enquanto uma pequena parcela exibia um tecido mais frouxo, predominantemente em células. Ao ser constatado a presença de vasos dilatados nas amostras, foi observado que a maioria do grupo obteve presença regular destes, com o resto do grupo variando de maneira semelhante seus resultados em presença leve, acentuada e bem acentuada. Com relação ao critério de casos apresentando hemorragia, nenhum foi notado neste grupo.

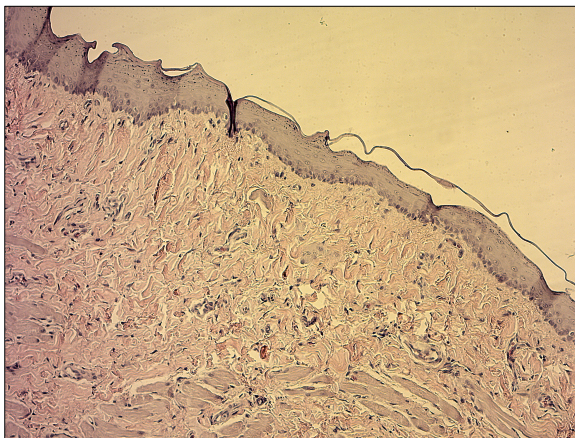


Figura 11 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento utilizando enxerto gengival livre proveniente do palato.

NOTAS: A) É possível observar ausência ou leve presença de crista epitelial, continuidade do epitélio, espessura epitelial fina e ausência de queratina, leve presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença regular de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

5.2.3 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana (CB)

As amostras do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com arcabouço feito de celulose bacteriana, de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Sobre as lâminas apresentarem ou não presença de crista epitelial, podemos observar que não houve um destaque para um nível específico de crista epitelial, onde as amostras se dividiram entre ausência, presença, presença regular e presença bem delimitada e constante de crista epitelial (neste último, foi observado apenas uma amostra). Em relação a continuidade do epitélio das amostras, foi observado que praticamente todas apresentavam continuidade epitelial, onde em apenas um caso contemplou descontinuidade do tecido epitelial. Perante a espessura epitelial exibida por este grupo, notamos que a maioria apresentou espessura epitelial fina, com uma parcela apresentando espessura regular. Observando a presença de queratina e a espessura da mesma, analisamos que a maioria apresentou camada fina de queratina, e boa parte apresentou ausência da mesma. Com relação a presença de infiltrado

inflamatório em tecido conjuntivo, podemos notar que a maioria do grupo apresentou quantidade acentuada de infiltrado inflamatório, com uma parcela apresentando presença leve da mesma. Perante ao quesito característica do tecido conjuntivo, as amostras apresentaram predominância de fibras colágenas desorganizadas em tecido conjuntivo, tendo como maioria um tecido fibroso, onde uma considerável minoria apresentou tecido frouxo, rico em células. Analisando a presença de vasos sanguíneos dilatados nas lâminas, percebemos que a grande maioria do grupo apresentou vasos dilatados de maneira regular a intensa, onde apenas uma amostra observamos presença leve da mesma. Com relação ao critério de presença de hemorragia, foram observados dois casos neste grupo.

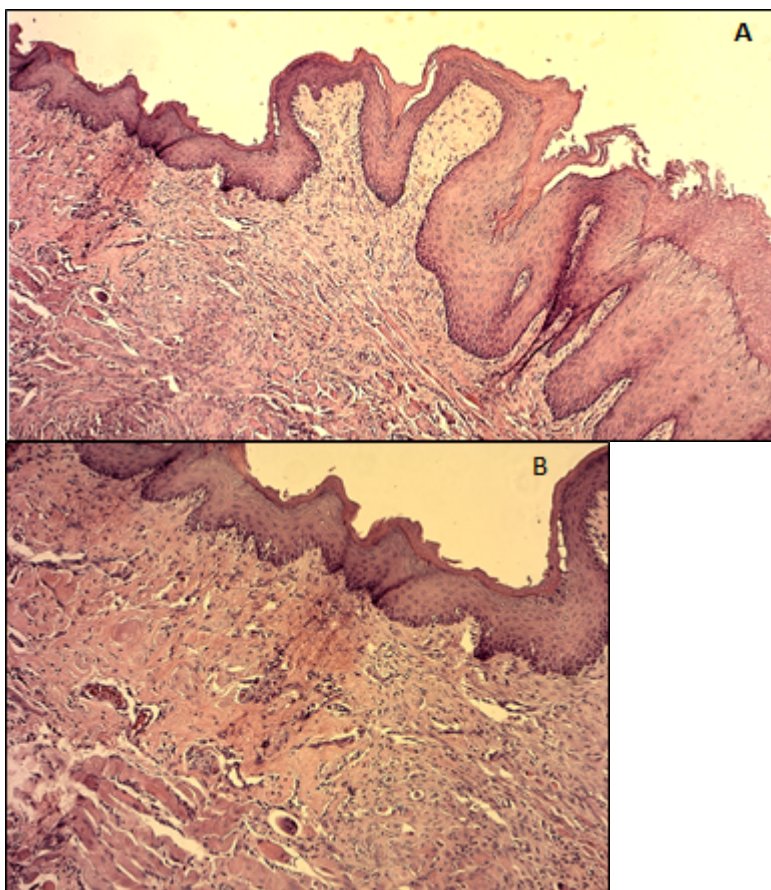


Figura 12 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com celulose bacteriana.

NOTAS: A) É possível observar na lâmina presença leve ou moderada de crista epitelial, continuidade do epitélio, espessura epitelial fina a moderada e camada fina de queratina (5X). B) Nesta lâmina, podemos observar acentuada presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença regular a intensa de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

5.2.4 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (SureDerm®) (MDA)

As amostras do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com arcabouço de matriz dérmica acelular (SureDerm), de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Sobre o fato das lâminas apresentarem ou não crista epitelial, analisamos que praticamente todas as amostras apresentavam leve presença de crista epitelial, porém um caso apresentou ausência da mesma. Em relação ao quesito de continuidade do tecido epitelial da amostra, foi notado que todas as amostras contemplavam continuidade epitelial, com exceção de uma amostra com descontinuidade. Observando a espessura epitelial das lâminas, percebemos que a maioria apresentou espessura regular, com a minoria apresentando espessura fina do mesmo. Analisando o critério de presença de queratina e a espessura da camada desta, é possível observar que a maioria apresentou espessura fina da camada de queratina, com a minoria apresentando ausência. Com relação a presença de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo, notamos que a grande maioria apresentou presença acentuada de infiltrado. Sobre as características do tecido conjuntivo das amostras, notamos que a maioria dos casos apresentou tecido fibroso em conjuntivo, com predominância de fibras colágenas desorganizadas, enquanto a minoria apresentou tecido predominantemente rico em células. Sobre o critério de presença de vasos sanguíneos dilatados nas amostras, foi possível perceber que a maioria apresentou presença acentuada de vasos dilatados, enquanto a outra parte do grupo apresentou presença regular do mesmo. Com relação aos casos apresentando hemorragia, nenhum foi notado neste grupo.

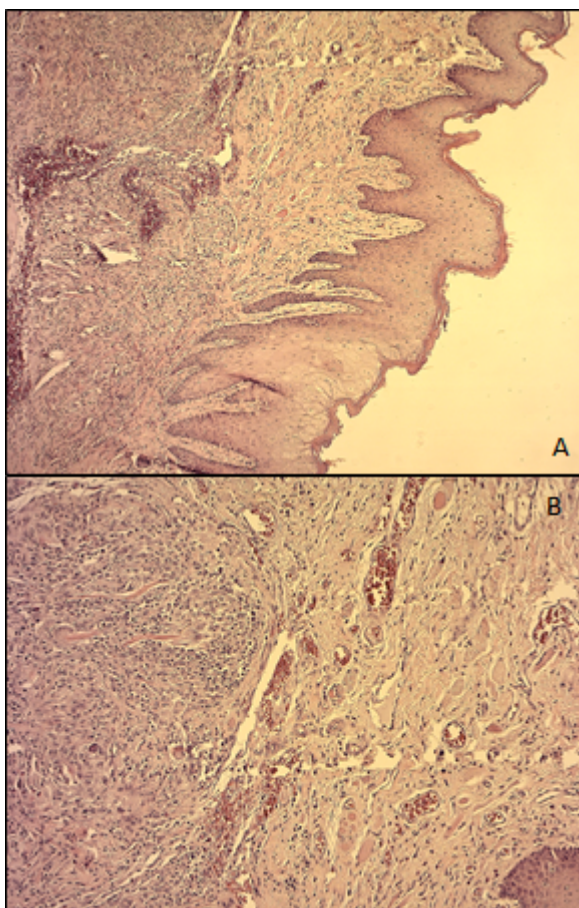


Figura 13 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular.

A) É possível observar na lâmina presença moderada de crista epitelial, continuidade do epitélio, espessura epitelial moderada e camada fina de queratina (5X). B) Nesta lâmina, podemos observar acentuada presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença acentuada de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

5.2.5 Grupo com recobrimento com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos (CB+CC)

As amostras do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com arcabouço de celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos, de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Em relação ao fato das lâminas apresentarem ou não crista epitelial, observamos que a grande maioria apresentou ausência de crista epitelial, onde poucas amostras apontaram presença leve e regular. Sobre o critério de continuidade do tecido epitelial, foi observado que metade das amostras apresentaram continuidade epitelial, quanto a outra metade apresentou descontinuidade da mesma. Ao analisar o quesito de espessura do epitélio das amostras, percebemos que a grande maioria apresentou espessura fina do epitélio, com a minoria variando entre ausência, fina a moderada, regular e acentuada. Em quanto ao critério de presença de queratina e espessura desta, notamos que a maioria exibiu ausência de queratina, onde os outros casos exibiram fina camada de queratina e casos onde ela se inicia fina e gradativamente aumentava até chegar a intensa. Analisando a apresentação de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo neste grupo, percebemos que a maioria apresentou presença moderada de infiltrado, apresentando uma minoria em presença leve e outra minoria em presença acentuada. Perante a característica do tecido conjuntivo, observamos que a grande maioria do grupo apresentou tecido conjuntivo com predominância a fibras colágenas, apresentando tecido fibroso. Com relação à presença de vasos sanguíneos dilatados em tecido conjuntivo, percebemos que na grande maioria das amostras, os vasos estavam dilatados de forma regular, com poucos casos apresentando presença leve ou intensa. Com relação aos casos apresentando hemorragia, neste grupo não foi observado.

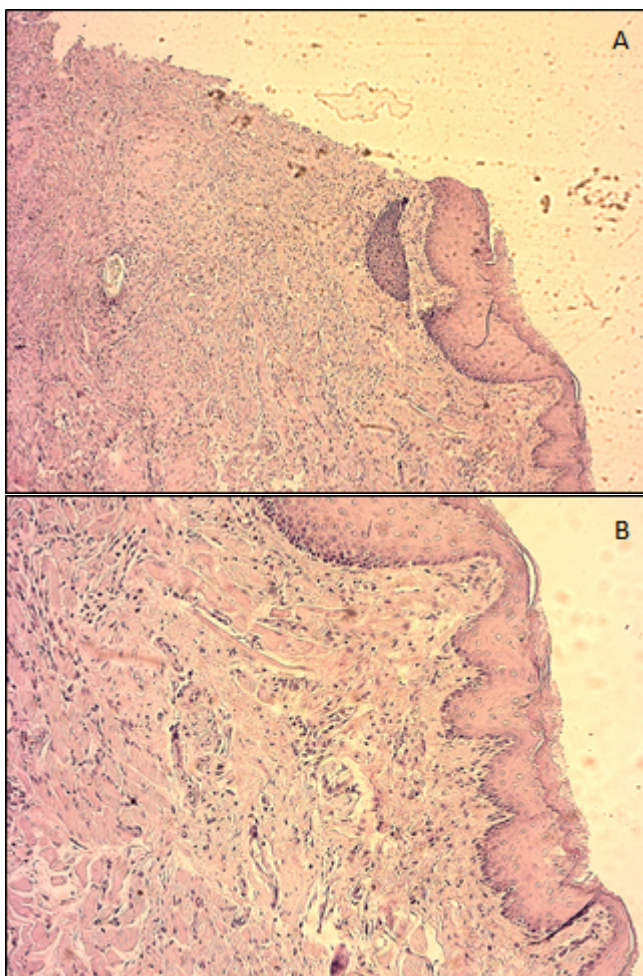


Figura 14 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com celulose bacteriana associado à cultura primária de fibroblastos.

NOTAS: A) É possível observar na lâmina ausência ou presença leve de crista epitelial, descontinuidade do epitélio, espessura epitelial fina e ausência de queratina (5X). B) Nesta lâmina, podemos observar moderada presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença regular de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

5.2.6 Grupo com recobrimento com matriz dérmica acelular (SureDerm®) associada à cultura primária de fibroblastos (MDA+CC)

As amostras do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com arcabouço de matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos, de maneira geral, obteve as seguintes características histológicas: Com relação ao fato das lâminas apresentarem ou não crista epitelial, observamos que a maioria do grupo apresentou crista epitelial bem delimitadas e constantes, onde o restante deste grupo apresentou ausência e leve presença de crista epitelial. Sobre o critério de continuidade do epitélio da amostra, foi notado que todo o grupo apresentou continuidade epitelial. Ao observarmos o critério de espessura do tecido epitelial, notamos que a maioria apresentou espessura moderada e constante ao decorrer da lâmina, com alguns casos apresentando espessura fina e outro com espessura moderada a intensa. Com relação a presença de queratina e a espessura da camada desta, percebemos que as amostras tiveram diferentes graus de camada queratinizada, onde variaram de forma semelhante em: fina a moderada, moderada e moderada a intensa. Perante a presença de infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, observamos que na grande maioria dos casos houve presença moderada de infiltrado inflamatório em conjuntivo, com um caso apresentando presença moderada a intensa. Quanto a característica do tecido conjuntivo, todo o grupo apresentou tecido conjuntivo fibroso, com predominância de fibras colágenas desorganizadas. Perante a presença de vasos sanguíneos dilatados em tecido conjuntivo, notamos que a grande maioria das amostras apresentaram moderada a intensa presença de vasos dilatados, enquanto um caso exibiu presença leve. Quanto ao critério de casos apresentando hemorragia, nenhum foi notado neste grupo.

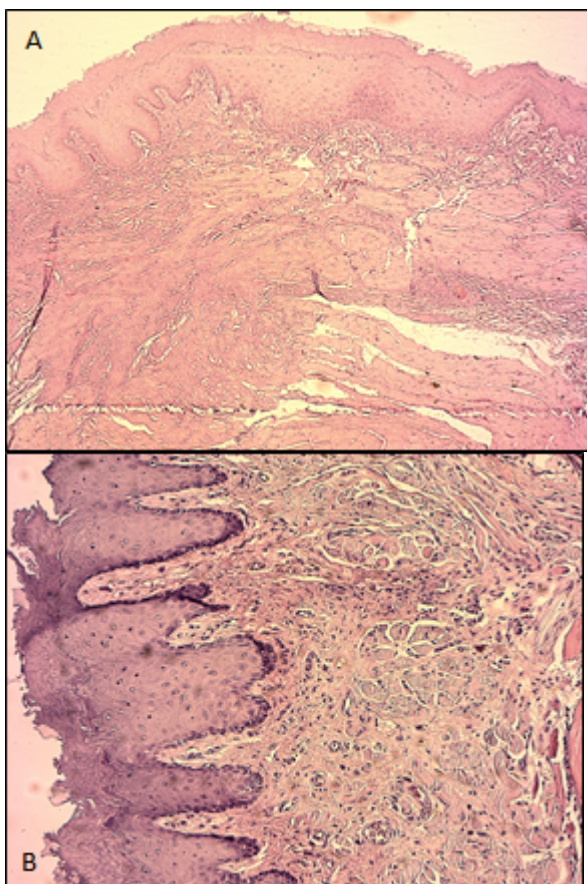


Figura 15 - Lâmina histológica do grupo no qual foi realizado recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos.

NOTAS: A) É possível observar lâmina presença moderada de crista epitelial, continuidade do epitélio, espessura epitelial moderada e camada moderada de queratina (5X). B) Nesta lâmina, podemos observar moderada presença de infiltrado inflamatório, conjuntivo em aspecto fibroso, presença regular a intensa de vasos sanguíneos dilatados e ausência de hemorragias (10X).

Tabela 2 - Características histológicas mais comuns das amostras dos grupos respectivos.

Grupo	Presença de Papilas	Continuidade do Epitélio	Espessura Epitelial	Camada de Queratina	Infiltrado Inflamatório	Aspecto do conjuntivo	Presença de vasos dilatados	PH
G1	Ausente	Continuidade	Fina	Ausente	Leve	Fibroso	Regular	Não
G2	Ausente	Continuidade	Fina	Ausente	Leve	Fibroso	Regular	Não
G3	Heterogêneo	Continuidade	Fina com parcela regular	Fina	Acentuado	Fibroso	Regular a intensa	Dois casos
G4	Leve presença	Continuidade	Regular	Fina	Acentuado	Fibroso	Intensa	Não
G5	Ausente	Metade continua, metade descontinua	Fina	Ausente	Moderado	Fibroso	Regular	Não
G6	Delimitadas e constantes	Continuidade	Moderada e constante	Espessura variada	Moderado	Fibroso	Moderada a intensa	Não

6 DISCUSSÃO

O objetivo deste trabalho foi estudar o comportamento de reparo dos tecidos gengivais de maneira a analisar a influência da utilização de biomaterias, como a celulose bacteriana e aloderme, bem como estes em associação a cultura primária de fibroblastos provenientes dos próprios animais, onde foi utilizado em meio de cultura plasma rico em plaquetas (PRP) para o cultivo das células, comparando-os com a cicatrização proveniente da enxertia de tecidos gengivais livre autógenos (padrão outro) e com a cicatrização em segunda intenção. Tendo bons resultados dos grupos utilizando arcabouços em comparação ao que se é preconizado atualmente, estes apresentariam um potencial futuro para novas alternativas ao que se é utilizado, sanando desvantagens atuais, como necessidade de um segundo sítio doador de tecido, causando morbidade ao paciente.

Através da análise clínica das lesões, observamos que o grupo controle positivo apresentou aspectos mais favoráveis de cicatrização, em comparação direta ao grupo negativo. Grupo positivo apresentou sinais pouco mais significantes de inflamação, como edema, rubor e presença de tecido de granulação, contudo, apresentou vasta quantidade de tecido queratinizado em região cicatrizada, característica de grande relevância, corroborando com resultados de estudos onde se realizou instalação de implantes dentários, na presença e ausência de mucosa queratinizada (BENGAZI ET AL. 2013), onde se afirma que em locais de ausência de mucosa queratinizada, ocorre maior reabsorção de crista alveolar e recessão marginal da mucosa, em comparação a regiões de mucosa mastigatória, com presença de tecido queratinizado.

Com relação aos resultados apresentados, o grupo positivo apresentou desvantagens em relação ao grupo negativo, como uma exacerbação inflamatória um pouco mais acentuada. Contudo, tendo em vista da importância de presença de tecido queratinizado, onde esta nos oferece particularidades como proteção, ganhos em sustentação, manutenção de higiene, redução de risco de doenças peri-implantares, estética, entre outros fatores (MOMBELLI, 2000; BUYUKOZDEMIR ASKIN ET AL., 2015). Podemos observar que o grupo positivo apresentou melhor aspecto clínico que o grupo negativo, com quantidade de mucosa queratinizada consideravelmente superior ao que o grupo negativo apresentou. Além destes pontos, grupo positivo apresentou tecido com superfície mais regularizada, consistência menos

fibrosa, com menos presença de úlceras nas amostras. Em relação ao edema, os analisadores suspeitam de que como o tecido de palato era consideravelmente espesso aos demais materiais, este poderia ser um fator colaborador desta característica.

O grupo onde foi realizado recobrimento da ferida apenas com celulose bacteriana, apresentou quantidade de tecido queratinizado levemente inferior em comparação ao grupo controle positivo, porém apresentou menos prevalência de tecido de granulação. Apresentou, na maioria das amostras, presença de ulceração ou perda de continuidade epitelial, por conta talvez da presença do remanescente do arcabouço utilizado. Em muitas amostras os observadores levantaram suspeita do material localizado no meio da lesão seja o arcabouço instalado. Analisamos sinais leves de inflamação, como rubor e edema em volta da lesão. Analisamos que a lesão apresentava-se com superfície regular e lisa, com aspecto de tecido frouxo, semelhante a mucosa jugal. Ao comparar com o grupo controle positivo, é possível afirmar que o grupo positivo possui mais tecido queratinizado que o grupo de celulose, possuindo características favoráveis, e também, o grupo de celulose apresentou maior incidência de úlceras, possuindo retardo na proliferação epitelial para o fechamento da ferida.

A celulose bacteriana tem várias utilidades e mostra-se uma relevante ferramenta para diversos fins, como para terapias de queimaduras, úlceras e manipulação tecidual em casos envolvendo implantes dentários. Comparando nossos resultados ao que se tem na literatura, podemos observar que a cicatrização foi previsível (RAMBO, 2008).

Durante anos, auto-enxertos veem sendo utilizados com grande sucesso, no entanto certas limitações forçam pesquisadores a procurarem enxertos alternativos onde supririam necessidades de conforto, compatibilidade e aceitabilidade pelo paciente. Na técnica de enxerto gengival livre, é necessário um segundo local cirúrgico para o tecido do doador, onde este sítio será cicatrizado por segunda intenção, podendo resultar em dor pós-operatória e morbidade. Os enxertos gengivais livres resultam em aparência estética desfavorável, em relação ao comportamento dos tecidos inseridos circunvizinhos a área operada, resultando em um resultado inestético. Além disso os enxertos autógenos não podem ser utilizados para aumentar a largura de gengiva inserida em vários elementos dentais por causa da oferta limitada do doador (COHEN, 2007).

Como potencial substituto a técnicas de enxertia com tecidos autógenos, o enxerto allderm ou matriz dérmica acelular vem sendo preconizado, onde foi demonstrado ser eficaz no aumento da largura da gengiva inserida (CALLAN e SILVERSTEIN, 1998; SHULMAN, 1996; HARRIS 2001) e pode ser utilizado como substituto para enxertos gengivais livres e enxertos de tecidos conjuntivos. Estudos que utilizam matriz dérmica acelular e enxertos de tecidos conjuntivos têm mostrado resultados semelhantes (HARRIS, 2001). O principal objetivo de utilizar esta alternativa é minimizar as complicações pós-cirúrgicas a desconforto ao paciente.

Estudos mostram que a matriz dérmica acelular proporciona uma espessura uniforme, é facilmente cortado, material bem-adaptável, e requer um curto período de tempo para re-hidratar antes de poder ser utilizado (WEI et al., 2000). Em contra partida, a colheita do tecido conjuntivo do palato é um procedimento demorado e o tamanho do enxerto pode ser limitada, além de gerar novo sítio cirúrgico, onde com matriz dérmica acelular este desconforto não é presenciado. Estudos que comparam matriz dérmica acelular e enxerto gengival livre demonstram que a matriz dérmica acelular não é tão eficaz na aumento da largura da gengiva inserida, porém é mais previsível em sua estética, misturando-se com o tecido adjacente. A quantidade de gengiva inserida adquirida com matriz dérmica acelular é clinicamente suficiente para prevenir inflamação persistente (WEI et al., 2000; HARRIS, 2001). A matriz dérmica acelular atua como uma estrutura de suporte para permitir o repovoamento de fibroblastos, vasos sanguíneos, no epitélio de tecidos circundantes, e é, eventualmente, completamente substituído por tecidos do hospedeiro (WEI et al., 2002).

Os resultados apresentados neste estudo foi fidedigno ao que é observado na literatura. O comportamento do grupo no qual era formado pelo recobrimento do ferimento com matriz dérmica acelular mostrou resultados semelhantes ao que o grupo controle positivo demonstrou (enxerto autógeno do palato). Foi analisado que este grupo obteve quantidade de mucosa queratinizada semelhante ao grupo positivo, onde observamos também menor apresentação de sinais inflamatórios, como presença de tecido de granulação, edema e rubor, em comparação a este mesmo grupo. Observamos que os aspectos clínicos apresentados foram semelhantes ao grupo positivo, apresentando aspecto de mucosa queratinizada, consistência fibrosa, superfície com leve rugosidade e irregularidade e coloração semelhante a mucosa queratinizada.

O grupo correspondente ao recobrimento da lesão com celulose bacteriana associada à cultura primária de fibroblastos apresentou quantidade de mucosa queratinizada semelhante ao grupo controle positivo. Foi registrado presença de ulceração em boa parte das amostras, demonstrando aspecto semelhantes ao grupo com apenas celulose, apresentando descontinuidade epitelial, onde os analisadores suspeitam de presença do arcabouço na lesão na minoria dos casos deste grupo. Foi observado sinais um pouco mais exacerbados de inflamação neste grupo em comparação ao grupo com apenas celulose (analisadores suspeitam que sinal de edema possa ser consequência do tecido estar com aspecto fibroso, em tecido conjuntivo), com praticamente metade das amostras apresentando o tecido com superfície lisa e regularizada, com aspecto frouxo, e outra metade apresenta-se com aspecto mais fibroso e superfície irregular e rugosa. Em comparação direta ao grupo controle positivo, observamos uma quantidade de tecido queratinizado semelhante entre os grupos, porém é notório que o grupo de celulose associado à cultura celular mostra descontinuidade de epitélio, presença de ulceração e sinais moderados de inflamação como tecido queratinizado, rubor e edema, tendo como grupo superior o controle positivo.

Em relação ao resultado do grupo no qual foi utilizado celulose bacteriana em associação à cultura primária de fibroblastos enriquecida com PRP em comparação a literatura, não foi observado relatos anteriores utilizando este material com esta cultura específica associada, determinando-se assim uma lacuna sobre este assunto na literatura científica.

O último grupo, correspondendo ao recobrimento do defeito com matriz dérmica acelular associado à cultura primária de fibroblastos apresentou resultados promissores. A quantidade de tecido queratinizado foi semelhante à apresentada pelo grupo controle positivo. Não foi observada ulcerações ou perdas de continuidade neste grupo. Foi analisado que houve ausência de sinais de inflamação como tecido de granulação, rubor ou edema, assim como ausência de percepção dos analistas em relação à presença de arcabouço visível. O aspecto do tecido é de boa cicatrização, superfície regular e lisa, consistência frouxa, coloração semelhante a mucosa adjacente, com locais de predominância à mucosa queratinizada.

Comparando diretamente ao grupo controle positivo (grupo que é padrão outro na literatura e, até então, melhor grupo apresentado), é

visto que o grupo com matriz dérmica acelular associada a cultura celular apresentou-se de forma superior ao grupo controle positivo, mostrando quantidade considerável de mucosa queratinizada, além de ausência de sinais inflamatórios e aspecto tecidual satisfatório, expondo cicatrização superior e melhor resultado da pesquisa.

Em relação ao resultado do grupo no qual foi utilizado matriz dérmica acelular em associação à cultura primária de fibroblastos enriquecida com PRP em comparação a literatura, não foi observado relatos anteriores utilizando este material com esta cultura específica associada, determinando-se assim uma lacuna sobre este assunto na literatura científica.

Ao compararmos os resultados histológicos obtidos na pesquisa, observamos que o grupo controle negativo, controle positivo e celulose associado à cultura celular, ambos apresentaram ausência de crista epitelial, no grupo de celulose houve uma diversidade de comportamentos, não havendo especificidade em seu comportamento, o grupo com matriz dérmica acelular apresentou leve presença de crista epitelial em suas amostras e o grupo de matriz dérmica acelular associado à cultura celular apresentou a maioria de suas amostras com presença de cristas epiteliais constantes e bem delimitadas, apresentando o melhor resultado deste aspecto.

Com relação a continuidade do epitélio, praticamente todas as amostras em todos os grupos apresentarem continuidade, com exceção de poucas amostras, porém o grupo de celulose associado à cultura teve o pior desempenho, apresentando metade das amostras com descontinuidade epitelial. Ao compararmos os resultados quanto a espessura do epitélio apresentada pelos grupos, percebemos que os grupos controle negativo, controle positivo, celulose e celulose associado à cultura celular apresentaram, em sua maioria, espessura epitelial fina, enquanto o grupo de matriz dérmica acelular apresentou uma espessura regular e o grupo matriz dérmica acelular associado à cultura celular apresentou melhor resultado com espessura regular e constante.

Analisando o quesito presença de queratina, é possível perceber que nos grupos controles e celulose associado à cultura celular, a maioria apresentou ausência de queratina, no grupo com celulose e matriz dérmica acelular notamos uma camada fina de queratina e no grupo de matriz dérmica celular associado à cultura celular houve graus variados de espessura de queratina. Em relação ao critério de presença

de infiltrado inflamatório em tecido conjuntivo, os grupos controles apresentaram leve presença de infiltrado, os grupos dos arcabouços sem cultura apresentaram presença acentuada de infiltrado inflamatório e os grupos com cultura celular apresentaram presença moderada de infiltrado inflamatório.

Comparando os resultados dos aspectos do tecido conjuntivo de cada grupo, percebemos que todos eles demonstraram tecido conjuntivo fibroso, com predomínio de fibras colágenas desorganizadas em tecido conjuntivo. Sobre a presença de vasos sanguíneos dilatados, observamos que os grupos apresentaram presença regular dos mesmos, nos grupos de celulose e matriz dérmica acelular associada à cultura celular apresentaram presença moderada a intensa. Com relação à presença de hemorragia em tecido conjuntivo, foi observado dois casos apenas no grupo de celulose.

Analizando estes comportamentos histológicos, podemos concluir que em 15 dias de cicatrização, os grupos foram muito similares entre si, com uma pequena diferença ao grupo de matriz dérmica acelular, onde exibiu características superiores de cicatrização. Esta situação nos dá diversidade nas opções de tratamento aos desafios clínicos contemporâneos, contudo são necessários estudos futuros com diferentes períodos de cicatrização, em outros sítios anatômicos, em outros tipos de organismos, para conclusões mais concretas sobre o comportamento clínico e histológicos destes materiais associados ou não às culturas celulares.

Dentre as possíveis limitações do trabalho, destacamos o tempo de cicatrização das lesões induzidas de 15 dias, onde outros períodos poderiam ressaltar resultados mais promissores entre os grupos. A utilização de animais de pequeno porte, pode ter influenciado em resultados diferentes ao desejado, que é o mais semelhante possível ao ser humano. Outro possível limitação seria a utilização de PRP como fator de crescimento à cultura primária de fibroblastos.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos e considerando as limitações metodológicas, é possível concluir que a matriz dérmica acelular associada à cultura primária de fibroblastos enriquecida por PRP obteve o melhor aspecto clínico e histológico apontado nesta pesquisa, apesar de que os resultados histológicos apresentados foram muito semelhante entre todos os grupos. Estudos adicionais são necessários para a utilização clínica em humanos destes arcabouços associado à células em procedimentos reconstrutivos.

REFERÊNCIAS

ADIBRAD M, SHAHABUEI M, SAHABI M. Significance of the width of kera- tinized mucosa on the health status of the supporting tissue around im- plants supporting overdentures. **J Oral Implantol** 2009;35:232e7.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise *in vitro* da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência.** 1999. Dissertação (Mestrado em Ciências – Opção Engenharia Biomédia) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos.

ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R.; ANTONIO, R. V.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; BARARDI, C. R. M.; SIMÕES, C. M. O. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 6, p. 843-848, 2003.

ANITUA E. - Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*, v.14, n.4, p.529-535, 1999.

ARMELIN H.A. – Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell grown. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.70, p.2702-2706, 1973.

ARMELIN H.A. – Hormones and regulation of cell division: mammalian cell cultures as an experimental approach. In: *Biochemical Actions of Hormones*, Ed. G. Litwack, vol. III: p.1-21 Academic Press Inc. New York.

ASSAEL, L.A. The promise os tissue engineering. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 61:155-156, 2003.

BÄCKDAHL H, HELENIUS G, BODIN A, NANNMARK U, JOHANSSON BR, RISBERG B, GATENHOLM P, **Biomaterials** 27 (2006) 2141.

BAUME L.J.; HOLZ J.; FIORE DONNO, G. Produits intermediaires d'obturation soumis au test biologique normalise [Biological testing of intermediate lining substances]. **J. Can. Dent. Assoc.**, Edinburg, v.38, p.18–27, 1972.

BENECKE JE JR. Tympanic membrane grafting with alloderm. **Laryngoscope** 2001;111:1525-1527.

BENFATTI, C. A. M. ; BEZ, L. V. ; MAGINI, R. S. . Viability Analysis of Subepithelial Connective Tissue Grafts Subjected to a Mechanical Expansion Process: A Histological Study in Dogs. **The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 31, p. e37-e44, 2011.

BENGAZI F, LANG NP, CAROPRESE M, et al. Dimensional changes in soft tissues around dental implants following free gingival grafting: an experimental study in dogs. **Clinical Oral Implants Research**. 2015, 176-182.

BLOCK MS, KENT JN. Factors associated with soft- and hard-tissue compromise of endosseous implants. **J Oral Maxillofac Surg** 1990;48(11):1153–60.

BODNER, L.; GROSSMAN, N. Autologous cultured mucosal graft to cover large intraoral mucosal defects: A clinical study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.61, p. 169-173, 2003.

BODNER, L.; GROSSMAN, N. The use of cultured mucosal graft for preprosthetic surgery. **J. Isr. Dent. Assoc.**, v. 18, p. 32-34, 2001.

BOURI JR A, BISSADA N, AL-ZAHRANI MS, FADDOUL F, NOUNEH I. Width of keratinized gingiva and the health status of the supporting tissues around dental implants. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2008;23:323e6.

BOYCE, S. T.; HANSBROUGH, J. F. Biologic attachment, growth, and differentiation of cultured human epidermal keratinocytes on a graftable collagen and chondroitin-6 sulfate substrate. **Surgery**, v. 103, p.421-431, 1988.

BRÅNEMARK PI, ADELL R, BREINE U, HANSSON BO, LINDSTRÖM J, OHLSSON A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. **Scand J Plast Reconstr Surg** 1969;3:81e100.

BREAUKT LG, FOWLER EB, BILLMAN MA. Retained free gingival graft rugae: a 9-year case report. **J Periodontol**. 1999;70(4):438-40.

BROOME WC, TAGGART EJ. Free autogenous connective tissue grafting – report of two cases. **J Periodontol**. 1976;47:580.

BROWN RM JR., WILLISON JH, RICHARDSON CL, **Proc. Natl. Acad. Sci., Cell Biology**, vol. 73, 1976, p. 4565.

BURT, A.M.; PALLET, C.D.; SLOANE, J.P.; O'HARE, M.J.; SCHAFER, K.F.; YARDENI, P.; ELDAD, A.; CLARKE, J.A.; GUSTERSON, B.A. Survival of culture allografts in patients with burns assessed with probe specific for Y chromosome. **Br. Med. J.**, London, v. 298, p.915-917, 1989.

BUYUKOZDEMIR ASKIN S, BERKER E, AKINCIBAY H, UYSAL S, ERMAN B, TEZCAN I, et al. Necessity of keratinized tissues for dental implants: a clinical, immunological, and radiographic study. **Clin Implant Dent Relat Res** 2015;17:1e12.

CAFFESSE RG, GUINARD EA. Treatment of localized gingival recessions. Part II. Coronally repositioned flap with a free gingival graft. **J Periodontol**. 1978;49(7):357-61.

CALLAN DP, SILVERSTEIN LH. Use of acellular dermal matrix for increasing keratinized tissue around teeth and implants. **Pract Periodontics Aesthet Dent**. 1998;10(6):731-4.

CAMARGO PM, MELNICK PR, KENNEY B. The use of free gingival grafts for aesthetic purposes. **Periodontology** 2000. Vol. 27, 2001 72-96
CAIRO F, PAGLIARO U, NIERI M. Treatment of gingival recession with coronally advanced flap procedures: a systematic review. **J Clin Periodontol** 2008;35: 136-62.

CANEVA M, BOTTICELLI D, VIGANÒ P, MORELLI F, REA M, LANG NP. Connective tissue grafts in conjunction with implants installed immediately into extrac- tion sockets. An experimental study in dogs. **Clin Oral Implants Res** 2013;24: 50-6.

CARREL, A. On the permanent life of tissues outside the organism. **J. Exp. Med.**, Hampshire, v. 15, p.516-528, 1912.

CASTOR SA, TO WC, PAPAY FA. Lip augmentation with AlloDerm acellular allogenic dermal graft and fat autograft: A comparison with autologous fat injection alone. **Aesthetic plast surg** 1999;23:218-223.

CHUNG DM, OH TJ, LEE J, MISCH CE, WANG HL. Factors affecting late implant bone loss: a retrospective analysis. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2007;22:117e26.

CLAVERO J, LUNDGREN S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. **Clin Implant Dent Relat Res**, 2003; 5 (3):154-160.

COURA, Gustavo dos Santos. Investigação do ligamento periodontal como potencial nicho de células tronco ectomesenquimias. Florianópolis, 2007. 93 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

COURA, G.S. Protocolo preliminar da cultura de fibroblastos de gengiva humana. Avaliação da viabilidade celular e dos possíveis danos causados ao DNA, 2004. 95f. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CLAVERO J, LUNDGREN S. Ramus or chin grafts for maxillary sinus inlay and local onlay augmentation: comparison of donor site morbidity and complications. **Clin Implant Dent Relat Res**, 2003; 5 (3):154-160.

DAMIEN JC, PARSON JR. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **Journal of Applied Biomaterials**, 1991; 2:187–208.

DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. **J Clin Periodontol.** 1980;7(4):316-24.

DORFMAN HS, KENNEDY JE, BIRD WC. Longitudinal evaluation of free autogenous gingival grafts. A four year report. **J Periodontol** 1982;53(6):349–52.

EAGLE H. – Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. **Science.** v.122, p.43-46, 1965.

EARLE, W.R. Production of malignancy in vitro: IV. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 4, p.165-212, 1943.

EDEL A. The use of a free connective tissue graft to increase the width of attached gingival. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 1975;39(3):341-6.

EL-ASKARY, A.S.; PIPCO, D.J. Autogenous and allogeneous bone grafting techniques to maximize esthetics: a clinical report. **J Prosthet Dent**, 83 (2): 153-157, 2000.

FENG Y., WANG J., LING S., LI Z., LI M., LI Q., et al. Differentiation of mesenchymal stem cells into neuronal cells on fetal bovine acellular dermal matrix as a tissue engineered nerve scaffold. **NRR** 2014;9:1968e78.

FERREIRA, Cimara Fortes. Avaliação incipiente da influência do plasma rico em plaquetas na proliferação de osteoblastos humanos : estudo in vitro. Florianópolis, 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

FISHER E, FRODEL JL. Facial suspension with acellular human dermal allograft. **Arch Facial Plast Surg** 1999; 1:195-199.

FILHO, J.S. Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular – estudo “ in vitro ”, 2002. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FOLKMAN, J.; HAUDENSCHILD, C. Angiogenesis *in vitro*. **Nature**, v. 288, p.551-556, 1980.

FONTANA, J. D.; DESOUSA, A. M.; FONTANA, C. K.; TORRIANI, I. L.; MORESCHI, J. C.; GALLOTTI, B. J.; DESOUSA, S. J.; NARCISCO, G. P.; BICHARA, J. A.; FARAH, L. F. X. Acetobacter Cellulose Pellicle as a Temporary Skin Substitute. **Appl Biochem Biotech**, v. 24, n. 5, p. 253-264, 1990.

FOWLER EB, BREAU LT LG. Ridge augmentation with a folded acellular dermal matrix allograft: A case report. **J Contemp Dent Pract** 2001;2:31-40.

FRESHNEY, RI. Biology of the cultured cell: a manual of basic technique. 2.ed. NewYork: Wiley-Liss, 1990. p.347.

FU JH, SU CY, WANG HL. Esthetic soft tissue management for teeth and implants. **J Evid Based Dent Pract** 2012;12(3 Suppl):129–42.

GALGUT, Peter apud RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, PITLOVANCIV AK, ANTÔNIO RV, PORTO LM. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. 549-554, 2008.

GEORGE J, RAMANA KV, SABAPATHY SN, JAGANNATH JH, BAWA AS, **Int. J. Biol. Macromol.** 37 (2005) 189

GEY, G. O.; COFFMAN, W. D.; KUBICEK, M. T. Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. **Cancer Res.**, v. 12, p.364-365, 1952.

GIANNOBILE W. - Periodontal tissue regeneration by polypeptide growth factors and gene transfer. *Tissue Engineering*. Illinois: **Quintessence Books**, 1999, p.231-243.

GIRARD S, SIDEMAN M, SPAIN DA. A novel approach to the problem of intestinal fistulization arising in patients managed with open peritoneal cavities. **Am J Surg** 2002;184:166-167.

GREEN, H.; KEHINDE, O.; THOMAS, J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 76, p.5665-5668, 1979.

GREENE L.A., SCHOOTER E.M. – The nerve growth factor: biochemistry, synthesis and mechanism of action. **Ann. Rev. Neurosci.** v.3, p.353-402, 1980.

GRIFFIN TJ, CHEUNG WS, ZAVRAS AI, DAMOULIS PD. Postoperative complications following gingival augmentation procedures. **J Periodontol**, 2006; 77: 2070-2079.

HAERI A, SERIO FG. Mucogingival surgical procedures: a review of the literature. **Quintessence Int.** 1999;30(7):475-83.

HALL WB. Present status of soft tissue grafting. **J Periodontol.** 1977;48(9):587-97.

HARRIS RJ. A short-term and long-term comparison of root coverage with an acellular dermal matrix and a subepithelial graft. **J Periodontol** 2004;75: 734–43.

HARRIS RJ. A comparative study of root coverage obtained with an acellular dermal matrix versus a connective tissue graft: Results of 107 recession defects in 50 consecutively treated patients. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2000;20:51-59.

HARRIS RJ. Cellular dermal matrix used for root coverage: 18-month follow-up observation. **Int J Periodontics Restorative Dent** 2002;22:156-163.

HARRIS RJ. Clinical evaluation of 3 techniques to augment keratinized tissue without root coverage. **J Periodontol** 2001;72:932-938.

HARRIS RJ. Gingival augmentation with an acellular dermal matrix: Human histologic evaluation of a case– placement of the graft on periosteum. **Int J Periodon- tics Restorative Dent** 2004;24:378-385.
HARRISON, R. G. Observations on the living developing nerve fiber. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 4, p.140-143, 1907.

HIRSCH A, GOLDSTEIN M, GOULTSCHIN J, et al. 2-year follow-up of root coverage using sub-pedicle acel- lular dermal matrix allografts and subepithelial con- nective tissue autografts. **J Periodontol** 2005;76(8): 1323–8.

HOLLEY R.W., KIERNAN J.A. – Contact inhibition of cell division in 3T3 cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.60, p.300-304, 1968.

HUANG, T.H.; TSAI, C.Y.; CHEN, S.L.; KAO, C.T. An evaluation of the cytotoxic effects of orthodontic bonding adhesives upon a primary human oral gingival fibroblast culture and a permanent, human oral cancer cell-line. **J. Biomed. Mater. Res.**, New York, v.63, n.6, p.814-821, 2002.

IMBERMAN, H. Gingival augmentation with an acellular dermal matrix revisited: surgical technique for gingival grafting. *Pract Proced Aesthet Dent*, 19 (2):123-128, 2007.

JAHNKE PV, SANDIFER JB, GHER ME, et al. Thick free gingival and connective tissue autografts for root coverage. **J Periodontol** 1993;64(4):315–22.

JONAS R, FARAH LF. Production and application of microbial cellulose. **Polym. Degrad. Stab.** 59 (1998) 101.

KARRING T, LANG NP, LOˆE H. The role of gingival con- nective tissue in determining epithelial differentia- tion. **J Periodontal Res** 1975;10:1–11.

KARRING T, OSTERGAARD E, LOE H. Conservation of tissue specificity after heterotopic transplantation of gingiva and alveolar mucosa. **J Periodontol Res** 1971;6:282–93.

KAWAHARA H, SHIOTA M, YAMAKAWA Y. Studies on the effects of dental metals upon the mesenchymal cells in tissue culture. **J. Osaka Odontol. Soc.**, Osaka, v.18, p.348, 1955.

KENNEDY JE, BIRD WC, PALCANIS KG, et al. A longitudinal evaluation of varying widths of attached gingiva. **J Clin Periodontol** 1985;12(8): 667–75.

KENT, L.W.; DYKEN, R.A.; RAHEMTULLA, F.; ALLISON, A.C.; MICHALEK, S.M. Effect of *in vitro* passage of healthy human gingival fibroblasts on cellular morphology and cytokine expression. **Archs. Oral Biol.**, v. 41, n. 3, p. 262-270, 1996.

KIM BS, KIM YK, YUN PY, YI YJ, LEE HJ, KIM SG, et al. Evaluation of peri-implant tissue response according to the presence of keratinized mucosa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2009;107:e24e8.

KRIDEL RW, FODA H, LUNDE KC. Septal perforation repair with acellular human dermal allograft. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1998;124:73-78.

LANGDON, J.; WILLIAMS, D.M.; NAVSARIA, H.; LEIGH, I.M. Autologous keratinocyte grafting: A new technique for intra-oral reconstruction. **Br. Dent. J.**, London, v. 171, n.3-4, p. 87-90, 1991.

LANGELAND L. K., GUTTUSO J, JEROME D.R., LANGELAND K. Histologic and clinical comparison of addent with silicate cements and cold-curing materials. **J. Am. Dent. Assoc.**, Chicago, v.72, p.373–385, 1966.

LANGER B, CALAGNA L. The alteration of lingual mucosa with free gingival grafts. Protection of a denture bearing surface. **J Periodontol** 1978;49(12): 646–8.

LAUER, G.; SCHIMMING, R. Tissue-engineered mucosa graft for reconstruction of the intraoral lining after freeing of the tongue: A clinical and immunohistologic study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 59, p. 169-177, 2001.

LEE, K. Y., ROWLEY, J. A, EISELT, P., MOY, E., BOUHAIR, K., MOONEY, D. Controlling mechanical and swelling properties of alginate hydrogels independently by crosslinker type and cross-linking density. **Macromolecules**, v. 33, p. 4291-4294, 2000.

LEON, P.E. Biotechnology for developing countries. The case of the Central American isthmus. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, New York, v.21, p.194-203, 1993.

LYNCH S.E., BUSER D., HERNANDEZ R.A., WEBER H.P., STICH H., OX C.H., WILLIAMS R.C. - Effects of the platelet-derived growth factor / Insulin-like growth factor-I combination on bone regeneration around titanium dental Implants. Results of a Pilot study in beagle dogs. **J. Periodontol.**, v.62, n. 11, p.710-716, 1991.

MADIHALLY, S. V.; MATTHEW, H. W. T. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 20, n. 12, p. 1133-1142, 1999.

MALEKZADEH, R.; HOLLINGER, J.O. ; BUCK, D. ; ADAMS, D.F. ; McALLISTER, B. S. Isolation of human osteoblasts-like cells and in vitro amplification for tissue engineering. **J. Periodontol.**, Boston, v. 69, p.1256-1262, 1998.

MARX R.E. - Platelet-rich plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. *Tissue Engineering: Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Illinois: **Quintessence Books**, 1999, p.71-82.

MARX R.E., CARLSON E.R., EICHSTAEDT R.M., SCHIMMELE S.R., STRAUSS J.E., GEOGERFF K. - Platelet-rich plasma : growth factor enhancement for bone grafts. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v.85, n.6, p.638-646, 1998.

MARX R.E., GARG A.K. - Bone Graft physiology with use of platelet – rich plasma and hiperbaric oxygen. *The Sinus Bone Graft*. Colorado: **Quintessence Books**, 1999, p.183-189.

MARX R.E., GARG A.K. - A estrutura óssea, o metabolismo e a fisiologia: Seu impacto na implantodontia dentária. ***Implant Dent.***, v.7, n.5, p.267-276, 1998.

MASTERS, J. R. W., ed. *Animal cell culture, a practical approach*, 3rd ed. **Oxford: IRL Press**. 2000

MATTER J, CIMASONI G. Creeping attachment after free gingival grafts. **J Periodontol** 1976;47(10): 574–9.

MAYNARD JG, WILSON RD. Physiologic dimensions of the periodontium significant to the restorative dentist. **J Periodontol** 1979; **50**: 170–174.

MCGUIRE MK, NUNN ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast-derived dermal substitute. I. Comparison to the gingival autograft: a randomized controlled pilot study. **J Periodontol** 2005;76:867-80.

MCKINNEY JR RV, STEFLICK DE, KOTH DL, SINGH BB. The scientific basis for dental implant therapy. **J Dent Educ** 1988;52:696e705.

MILLER PD. Root coverage using the free soft tissue autograft following citric acid application. III. A successful and predictable procedure in areas of deep-wide recession. **Int J Periodontics Restorative Dent** 1985;5(2):14–37.

MOMBELLI A. Microbiology and antimicrobial therapy of peri-implantitis. **Periodontol** 2000 2002;28:177e89.

MOON IS, BERGLUNDH T, ABRAHAMSSON I, LINDER E, LINDHE J. The barrier between the keratinized mucosa and the dental implant. An experimental study in the dog. **J Clin Periodontol** 1999;26:658e63.

NEHRER, S.; BREINAN, H. A.; RAMAPPA, A.; SHORTKROFF, S.; YOUNG, G.; MINAS, T.; SLEDGE, C. B.; YANNAS, I. V.; SPECTOR, M. Canine chondrocytes seeded in type I and type II collagen implants investigated in vitro. **J Biomed Mater Res**, v. 38, p. 95-104, 1997.

NETO, A.R.P. Análise do comportamento de fibroblastos gengivais cultivados sobre diferentes tipos de membranas reabsorvíveis, 2010. Dissertação (Mestrado em Odontologia – Opção Implantodontia) – Programa de Pós- Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

NOVAES JUNIOR AB, PPALEXIOU V, LUCZYSZYN SM, et al. Immediate implant in extraction socket with acellular dermal matrix graft and bioactive glass: A case report. **Implant Dent** 2002;11:343-348.

NOVAES, Arthur Belem Júnior apud JONAS R, FARAH LF. Production and application of microbial cellulose. **Polym. Degrad. Stab.** 59 (1998) 101.

PEAT, N.; GENDLER, S.J.; LALANI, N.; DUHIG, T.; TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. Tissue-specific expression of human polymorphic epithelias mucin (MUC1) in transgenic mouse. **Cancer Res.**, local?, v. 52, p.1954-1960, 1992.

PEGO, A P., POOT, A, GRIJMA, D., FEIJEN, J. Biodegradable elastomeric scaffolds for soft tissue engineering. **J. Control. Rel.**, v. 87, p. 69-79, 2003.

PIEPER, J. S., OOSTERHOF, A., DIJKSTRA, P. J., VEERKAMP, J.H., KUPPEVELT, T. H. Preparation and characterization of porous crosslinked collagenous matrices containing bioavailable chondroitin sulphate. **Biomat.**, v. 20, p. 847-848, 1999.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C. Tissue engineering technology for gingival augmentation procedures: A case report. **Int. J. Periodont. Rest. Dent.**, v.20, p.553-559, 2000.

PINI PRATO, G.P.; ROTUNDO, R.; MAGNANI, C.; SORANZO, C.; MUZZI, L.; CAIRO, F. An autologous cell hyaluronic acid graft technique for gingival augmentation : A case series. **J. Periodontol.**, Chicago, v.74, n.2, p.262-267, 2003.

PITANGUY, Ivo apud RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, PITLOVANCIV AK, ANTÔNIO RV, PORTO LM. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. 549-554, 2008.

PRATA, C.A.; LACERDA, S.A.; BRENTAGANI, L.G. Autogenous bone graft associated with enamel matrix proteins in bone repair. *Implant Dent*, 16(4): 413-420, 2007.

RAGHOEBAR, G.M.; TOMSON, A.M.; SCHOLMA, J; BLAAUW, E.H.; WITJES, M.J.; VISSINK, A. Use of cultured mucosal graft to cover defects caused by vestibuloplasty: An vivo study. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v. 53, n. 8, p. 872-878, 1995.

RAMBO CR, RECOUVREUX DOS, CARMINATTI CA, et al. Template assisted synthesis of porous nanofibrous cellulose membrane for tissue engineering. **Materials Science & Engineering**. 549-554, 2008.

RATEITSCHAK KH, EGLI U, FRINGELI G. Recession: a 4- year longitudinal study after free gingival grafts. **J Clin Periodontol** 1979;6(3):158-64.

RAVEL R. - Laboratório Clínico: Aplicações clínicas dos dados laboratoriais. 6.ed, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 1997, p.109-129.

RENNERT R.C., SORKIN M., GARG R.K., JANUSZYK M., GURTNER G.C. Cellular response to a novel fetal acellular collagen matrix: implications for tissue regeneration. *Int J Polym Mater* 2013;2013:527957.

RHEE PH, FRIEDMAN CD, RIDGE JA, et al. The use of processed allograft dermal matrix for intraoral resurfacing: An alternative to split-thickness skin grafts. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1998;124:1201- 1204.

RIPAMONTI U., REDDI A.H. - – Periodontal regeneration: potential role of bone morphogenetic proteins. **J. Periodontal Res.**, v.29, p.225-235, 1994.

ROSS R., GLOMSET J., KARIYA B., RAINES E. – Role of platelet factors in the growth of cells in culture. **Natl. Cancer Inst. Monogr.** v.48, p.103-108, 1978.

ROSS P, MAYER R, BENZIMAN M, **Microbiol. Rev.** 55 (1991) 35.
ROSSA JÚNIOR, C.; MARTINEZ, K.G.; SILVÉRIO, A.E.T. Efeito da nicotina na viabilidade e morfologia de fibroblastos – estudo *in vitro*. **Pesqui. Odontol. Brás.**, São Paulo, v. 16, n. 3, p:234-238, 2002.

SALVI GE, LANG NP. Diagnostic parameters for monitoring peri-implant conditions. **Int J Oral Maxillofac Implants** 2004;19:116e27.

SANCHAVANAKIT, N.; SANGRUNGRAUNGROJ, W.; KAOMONGKOLGIT, R.; BANAPRASERT, T.; PAVASANT, P.; PHISALAPHONG, M. Growth of human keratinocytes and fibroblasts on bacterial cellulose film. **Biotechnol Progr**, v. 22, n. 4, p. 1194- 1199, 2006.

SANT'ANNA, A.C.P.; MARQUES, M.M.; BARROSO, E.C.; PASSANEZI, E. Cultura e caracterização de células derivadas de ligamento periodontal humano. **Rev. Fac. Odontol.**, Bauru, v. 10, n. 3, p. 134-140, 2002.

SATO, J.D.; HAYASHI, I.; HAYASHI, J.; HOSHI, H. KAWAMOTO, T.; McKEEHAN, W.L.; MATSUDA, R.; MATSUZAKI, K.; MILLS, K.H.G.; OKAMOTO, T.; SERRERO, G. SUSSMAN, D.J.; KAN, M. Specific cell types and their requirements. In: DAVIS, J.M. (Ed.). **Basic Cell Culture: a practical approach**. Oxford University Press: New York. 1994. p.181-222. Cap. 6.

SCARSO FILHO, José. Avaliação do plasma rico em plaquetas na proliferação celular : estudo in vitro. Florianópolis, 2002. 75 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

SCHROEDER A, VAN DER ZYPEN E, STICH H, SUTTER F. The reactions of bone, connective tissue, and epithelium to endosteal implants with titanium- sprayed surfaces. **J Maxillofac Surg** 1981;9:15e25.

SHULMAN J. Clinical evaluation of an acellular dermal allograft for increasing the zone of attached gingiva. **Pract Periodontics Aesthet Dent** 1996;8:201-208.

SERINO G, STRÖM C. Peri-implantitis in partially edentulous patients: association with inadequate plaque control. **Clin Oral Implants Res** 2009;20:169e74.

SIVERSTEIN LH. Fundamentally changing soft tissue grafting. **Dent Today**. 1997;16(3):56-9.

SILVERSTEIN LH, CALLAN DP. An acellular dermal matrix allograft substitute for palatal donor tissue. **Postgrad Dent**. 1996;3(4):14- 21.

SULLIVAN HC, ATKINS JH. Free autogenous gingival grafts. I. Principles of successful grafting. **Periodontics**. 1968;6(3):121-9.

SULLIVAN H, ATKINS J. Free autogenous gingival grafts. III. Utilization of grafts in the treatment of gingival recession. **Periodontics** 1968;6:152–

SVENSSON A, NICKLASSON E, HARRAH T, PANILAITIS B, KAPLAN DL, BRITTBERG M, GATENHOLM P, **Biomaterials** 26 (2005) 419.

TAL H. Subgingival acellular dermal matrix allograft for the treatment of gingival recession: A case report. **J Periodontol** 1999;70:1118-1124.

TAL H, MOSES O, ZOHAR R, et al. Root coverage of advanced gingival recession: A comparative study between acellular dermal matrix allograft and subepithelial connective tissue grafts. **J Periodontol** 2002; 73:1405-1411.

WAINWRIGHT DJ. Use of an acellular allograft dermal matrix (AlloDerm) in the management of full-thickness burns. **Burns** 1995;21:243-248.

WAINWRIGHT D, MADDEN M, LUTERMAN A, et al. Clinical evaluation of an acellular allograft dermal matrix in full-thickness burns. **J Burn Care Rehabil** 1996;17: 124-136.

WARRER K, BUSER D, LANG NP, KARRING T. Plaque-induced peri-implantitis in the presence or absence of keratinized mucosa. An experimental study in monkeys. **Clin Oral Implants Res** 1995;6:131e8.

WATANABE K, TABUCHI M. Structural Features and Properties of Bacterial Cellulose Produced in Agitated Culture. **Cellulose**, Vol. 5 (1998) 187-200

WEI PC, LAURELL L, GEIVELIS M, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 1. A clinical study. **J Periodontol** 2000;71: 1297-1305.

WEI PC, LAURELL L, LINGEN MW, et al. Acellular dermal matrix allografts to achieve increased attached gingiva. Part 2. A histological comparative study. **J Periodontol** 2002;73:257-265.

WENNSTROM JL, LINDHE J. Role of attached gingiva for maintenance of periodontal health. Healing following excisional and grafting procedures in dogs. **J Clin Periodontol** 1983;10(2):206-21.

WHEITZ-MAYFIELD LJ. Peri-implant diseases: diagnosis and risk indicators. **J Clin Periodontol** 2008;35:292e304.

WILSON TG JR, MCGUIRE MK, NUNN ME. Evaluation of the safety and efficacy of periodontal applications of a living tissue-engineered human fibroblast- derived dermal substitute. II. Comparison to the subepithelial connective tissue graft: a randomized controlled feasibility study. **J Periodontol** 2005;76: 881-9.

WU Q, QU Y, GONG P, et al. Evaluation of the efficacy of keratinized mucosa augmentation techniques around dental implants: A systematic review. *The Journal of Prosthetic Dentistry*. 2005

ZHANG X.J., DENG Z.H., WANG H.L., YANG Z.H., GUO W.H., LI Y., et al. Expansion and delivery of human fibroblasts on micronized acellular dermal matrix for skin regeneration. **Biomaterials** 2009;30(14):2666e74.

ZIGDON H, MACHTEI EE. The dimensions of keratinized mucosa around implants affect clinical and immunological parameters. **Clin Oral Implants Res** 2008;19:387e92.

ANEXO A – Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA – UFSC).

Resultado de Solicitação de Protocolo

Protocolo

PP00908

Título

Cultura Primária de Fibroblastos: Avaliação In Vivo

Data de Entrada

20/02/2014

Resultado:

Aprovado

Data/Prazo

29/05/2014

Considerações

Ofício nº 145/CEUA/PROPESQ/2014

Do: Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais-CEUA

Ao(à): Prof(a) Dr(a) Cesar Augusto Benfatti - Departamento de Odontologia - CCS

Prezado(a) Professor(a),

Em relação ao projeto de pesquisa sob sua responsabilidade o presidente da CEUA deliberou ad referendum, considerando o parecer de dois relatores, pela:

- APROVAÇÃO para a utilização de 50 ratos (*Rattus norvegicus*) pelo período de 2 anos a partir da data de credenciamento.
- vide parecer em anexo.

Relatório Final previsto para (90 dias após término da vigência do protocolo ou no momento da apresentação de um novo protocolo)

Data 29/08/2016

Data 29/05/2014

Parecer(es):



**Prof. Assoc. Carlos Rogério Tonussi, D.Sc.
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – PRPE – UFSC
PRESIDENTE**